This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

Usage guidelines

Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

+ *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.

+ *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.

+ *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.

+ *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at `http://books.google.com/`

Über dieses Buch

Dies ist ein digitales Exemplar eines Buches, das seit Generationen in den Regalen der Bibliotheken aufbewahrt wurde, bevor es von Google im Rahmen eines Projekts, mit dem die Bücher dieser Welt online verfügbar gemacht werden sollen, sorgfältig gescannt wurde.

Das Buch hat das Urheberrecht überdauert und kann nun öffentlich zugänglich gemacht werden. Ein öffentlich zugängliches Buch ist ein Buch, das niemals Urheberrechten unterlag oder bei dem die Schutzfrist des Urheberrechts abgelaufen ist. Ob ein Buch öffentlich zugänglich ist, kann von Land zu Land unterschiedlich sein. Öffentlich zugängliche Bücher sind unser Tor zur Vergangenheit und stellen ein geschichtliches, kulturelles und wissenschaftliches Vermögen dar, das häufig nur schwierig zu entdecken ist.

Gebrauchsspuren, Anmerkungen und andere Randbemerkungen, die im Originalband enthalten sind, finden sich auch in dieser Datei – eine Erinnerung an die lange Reise, die das Buch vom Verleger zu einer Bibliothek und weiter zu Ihnen hinter sich gebracht hat.

Nutzungsrichtlinien

Google ist stolz, mit Bibliotheken in partnerschaftlicher Zusammenarbeit öffentlich zugängliches Material zu digitalisieren und einer breiten Masse zugänglich zu machen. Öffentlich zugängliche Bücher gehören der Öffentlichkeit, und wir sind nur ihre Hüter. Nichtsdestotrotz ist diese Arbeit kostspielig. Um diese Ressource weiterhin zur Verfügung stellen zu können, haben wir Schritte unternommen, um den Missbrauch durch kommerzielle Parteien zu verhindern. Dazu gehören technische Einschränkungen für automatisierte Abfragen.

Wir bitten Sie um Einhaltung folgender Richtlinien:

+ *Nutzung der Dateien zu nichtkommerziellen Zwecken* Wir haben Google Buchsuche für Endanwender konzipiert und möchten, dass Sie diese Dateien nur für persönliche, nichtkommerzielle Zwecke verwenden.

+ *Keine automatisierten Abfragen* Senden Sie keine automatisierten Abfragen irgendwelcher Art an das Google-System. Wenn Sie Recherchen über maschinelle Übersetzung, optische Zeichenerkennung oder andere Bereiche durchführen, in denen der Zugang zu Text in großen Mengen nützlich ist, wenden Sie sich bitte an uns. Wir fördern die Nutzung des öffentlich zugänglichen Materials für diese Zwecke und können Ihnen unter Umständen helfen.

+ *Beibehaltung von Google-Markenelementen* Das "Wasserzeichen" von Google, das Sie in jeder Datei finden, ist wichtig zur Information über dieses Projekt und hilft den Anwendern weiteres Material über Google Buchsuche zu finden. Bitte entfernen Sie das Wasserzeichen nicht.

+ *Bewegen Sie sich innerhalb der Legalität* Unabhängig von Ihrem Verwendungszweck müssen Sie sich Ihrer Verantwortung bewusst sein, sicherzustellen, dass Ihre Nutzung legal ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass ein Buch, das nach unserem Dafürhalten für Nutzer in den USA öffentlich zugänglich ist, auch für Nutzer in anderen Ländern öffentlich zugänglich ist. Ob ein Buch noch dem Urheberrecht unterliegt, ist von Land zu Land verschieden. Wir können keine Beratung leisten, ob eine bestimmte Nutzung eines bestimmten Buches gesetzlich zulässig ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass das Erscheinen eines Buchs in Google Buchsuche bedeutet, dass es in jeder Form und überall auf der Welt verwendet werden kann. Eine Urheberrechtsverletzung kann schwerwiegende Folgen haben.

Über Google Buchsuche

Das Ziel von Google besteht darin, die weltweiten Informationen zu organisieren und allgemein nutzbar und zugänglich zu machen. Google Buchsuche hilft Lesern dabei, die Bücher dieser Welt zu entdecken, und unterstützt Autoren und Verleger dabei, neue Zielgruppen zu erreichen. Den gesamten Buchtext können Sie im Internet unter `http://books.google.com` durchsuchen.

UC-NRLF
B 3 482 144

BERKELEY
LIBRARY
UNIVERSITY OF
CALIFORNIA
BIOCHEM.

THE LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

BIOCHEM.

HERMANN O. L. FISCHER
COLLECTION

PRESENTED BY HIS WIFE

1994

BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ERSTER BAND

BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE GESAMTE BIOCHEMIE

UNTER

MITWIRKUNG VON FACHGENOSSEN HERAUSGEGEBEN

VON

FRANZ HOFMEISTER

O. PROFESSOR DER PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STRASSBURG

ERSTER BAND

BRAUNSCHWEIG

DRUCK UND VERLAG VON FRIEDRICH VIEWEG UND SOHN

1902

Alle Rechte, namentlich dasjenige der Übersetzung in fremde Sprachen, vorbehalten.

BIOCHEM.

GIFT

QP
B4
BIOCHEM.
LIBRARY

INHALT.

A. Abhandlungen.

Seite

I. Über die Vorstufen der Magenfermente. Von Dr. Karl Glaessner aus Prag. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.) 1

II. Über die örtliche Verbreitung der Profermente in der Magenschleimhaut. Von Dr. Karl Glaessner aus Prag. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.) 24

III. Zur Kenntnis der Entstehung der Kynurensäure im Organismus. Von Dr. Karl Glaessner aus Prag und Dr. Leo Langstein aus Wien. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.) 34

IV. Zur Kenntnis der tryptischen Eiweifsspaltung. Von Dr. Junichi Mochizuki aus Kioto (Japan). (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.) 44

V. Über Ricin-Immunität. Von Dr. Martin Jacoby, Assistent des pharmakologischen Instituts zu Heidelberg. (Aus dem pharmakologischen Institut zu Heidelberg.) 51

VI. Über die gerinnbaren Stoffe des Eierklars. Von Dr. Leo Langstein aus Wien. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.) 83

VII. Über die Funktion der Brunnerschen Drüsen. Von Dr. Karl Glaessner aus Prag. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.) 105

VIII. Das Verhalten des Fettes bei der Autolyse der Leber. (Ein Beitrag zur Theorie der fettigen Degeneration.) Von Dr. F. Siegert, Privatdozent der Kinderheilkunde in Strafsburg. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.) . 114

IX. Über die koagulierende Wirkung des Papayotins auf Peptonlösungen. Von Privatdozent Dr. D. Kurajeff. (Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der militärmedizin. Akademie zu St. Petersburg.) 121

X. Über die Beziehung der Autolyse zur Blutgerinnung. Von Dr. H. Conradi. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.) 136

XI. Über das Verhalten der festen und flüssigen Fettsäuren im Fett des Neugeborenen und des Säuglings. Von Dr. F. Siegert, Privatdozent der Kinderheilkunde in Strafsburg. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.) 183

XII. Über die Bildung bakterizider Stoffe bei der Autolyse. Von Dr. H. Conradi, früherem Assistenten d. hygienischen Instituts zu Strafsburg. (Aus den Instituten für physiologische Chemie und für Hygiene und Bakteriologie zu Strafsburg.) 193

Seite

XIII. Über tierische Tyrosinasen und ihre Beziehungen zur Pigmentbildung. Von Privatdozent Dr. Otto v. Fürth und Hugo Schneider, Assistenten am physiologisch-chemischen Institut zu Straſsburg. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straſsburg.) 229

XIV. Zur Kenntnis des Suprarenins. Von Privatdozent Dr. Otto v. Fürth, Assistent am physiologisch-chemischen Institut zu Straſsburg. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straſsburg.) 243

XV Über Glykoproteide niederer Tiere. Von Privatdozent Dr. Otto v. Fürth, Assistent am physiologisch-chemischen Institut zu Straſsburg. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straſsburg und aus der zoologischen Station zu Neapel.) . . 252

XVI. Die Kohlehydrate des krystallisierten Serumalbumins. Von Dr. Leo Langstein aus Wien. (Aus dem physiolog.-chemischen Institut zu Straſsburg.) 259

XVII. Beiträge zur Lehre von der Säurevergiftung bei Hund und Kaninchen. Von K. Spiro. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straſsburg.) 269

XVIII. Über die Bindung des Quecksilbers und Arsens durch die Leber. Von Dr. B. Slowtzoff (St. Petersburg) 281

XIX. Zur Kenntnis der Einwirkung der Enzyme aufeinander. Von A. Wróblewski, B. Bednarski und M. Wojczyński . . 289

XX. Über die Borneol- u. Mentholglykuronsäure. Von Dr. A. Bonanni, Assistent am pharmakologischen Institut zu Rom. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straſsburg.) 304

XXI. Über den Ort der Ätherschwefelsäurebildung im Tierkörper. Von Dr. Gustav Embden und Dr. Karl Glaessner. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straſsburg.) . . . 310

XXII. Über die Umwandlung der Albumosen durch die Magenschleimhaut. Von Dr. Karl Glaessner aus Prag. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straſsburg.) 328

XXIII. Zur Kenntnis der aromatischen Gruppe im Eiweiſsmolekül. Von Dr. Virgilio Ducceschi, Privatdozent und Assistent für Physiologie in Rom. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straſsburg.) 339

XXIV. Die aromatische Gruppe des Leims. Von K. Spiro. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straſsburg.) 347

XXV. Zur Kenntnis der Immunkörper. Erste Mitteilung: Versuche zur Isolierung von Immunkörpern des Blutserums. Von Dr. Ernst P. Pick. [Aus dem k. k. serotherapeutischen Institut zu Wien (Vorstand: Prof. Dr. R. Paltauf) und dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolfstiftung“ (Vorstand: Dr. E. Freund).] 351

XXVI. Zur Kenntnis der Immunkörper. Zweite Mitteilung: Über die bei der Agglutination und der spezifischen Niederschlagsbildung (Kraus) beteiligten Substanzen. Von Dr. Ernst P. Pick. [Aus dem k. k. serotherapeutischen Institut zu Wien (Vorstand: Prof. Dr. R. Paltauf) und dem patholog.-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolfstiftung“ (Vorstand: Dr. E. Freund).] 393

Seite

XXVII. Zur Kenntnis der Immunkörper. Dritte Mitteilung. Über die Einwirkung chemischer Agentien auf die Serumkoaguline, Agglutinine, sowie auf den Vorgang der spezifischen Niederschlagsbildung und der Agglutination. Von Dr. Ernst P. Pick. [Aus dem k. k. serotherapeutischen Institut zu Wien (Vorstand: Prof. Dr. R. Paltauf) und dem patholog.-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolfstiftung" (Vorstand: Dr. E. Freund).] 445

XXVIII. Über die Bildung von Phenol und Indoxyl im intermediären Stoffwechsel und deren Beziehung zur Glykuronsäureausscheidung. Von Carl Lewin, prakt. Arzt. (Aus dem Laboratorium der I. medizinischen Klinik. Direktor: Geheimer Medizinalrat Prof. Dr. von Leyden.) 472

XXIX. Über das Auftreten von Oxyphenyläthylamin bei Pankreasverdauung und über fermentative CO_2-Abspaltung. Von Dr. R. L. Emerson (Boston U. S. A.). (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.) 501

XXX. Zur Kenntnis der Endprodukte der peptischen Verdauung. Von Dr. Leo Langstein aus Wien. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.) 507

XXXI. Über die Zusammensetzung der Eiweißstoffe und Zellmembranen bei Bakterien und Pilzen. Von K. S. Iwanoff. [Aus dem pharmakologischen Laboratorium der Kaiserl. militär-medizinischen Akademie zu St. Petersburg (Dir.: Prof. N. P. Krawkow).] 524

XXXII. Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung der Pflanzen. Von F. Czapek. 538

XXXIII. Über Guanidinzersetzung im Tierkörper. Von Dr. Ernst Pommerrenig, Assistent. (Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität in Prag.) 561

XXXIV. Einige Bemerkungen über die Zuckerbildung aus Proteinstoffen. Von Oskar Loew 567

XXXV. Zur Kenntnis des Krötengiftes. Von Dr. Fr. Pröscher. (Aus dem kgl. preuß. Institut für experim. Therapie, Frankf. a. M.) 575

B. Kürzere Mitteilungen.

1. Über die Einwirkung der Serumglobuline auf die Gerinnung des Muskelplasmas. Von K. Spiro 78

2. Über die Verwendbarkeit der Schilfschläuche zur Dialyse. Von P. Philippson. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.) 80

3. Zur Frage des Nucleohistons. Von I. Bang 189

4. Über die Entstehung von Aceton aus krystallisiertem Ovalbumin. Von Dr. Arnold Orgler. 583

I.

Über die Vorstufen der Magenfermente.

Von Dr. **Karl Glaessner** aus Prag.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

Die Kenntnis der Zymogene der Magenschleimhaut ist nicht alt. Im Jahre 1872 hat Hammarsten[1]) zuerst in klarer Form ausgesprochen, dafs die Magenschleimhaut der Säugetiere einen wasserlöslichen Stoff enthält, welcher selbst nicht Lab ist, aus dem aber bei Zusatz einer Säure binnen kurzem Lab gebildet wird. Bald darauf wurde von Ebstein und Grützner[2]) mitgeteilt, dafs es durch passende Behandlung mit Salzsäure gelingt, die aus Fundusschleimhaut durch Wasser erhältliche Pepsinmenge zu erhöhen. Sie gelangten zu der Schlufsfolgerung: „Das Pepsin existiert nicht als solches in den Hauptzellen des Fundus und in den Drüsenzellen des Pylorus, sondern in einer Vereinigung mit den Albuminaten." Sie nannten diese Vorstufe des Pepsins: pepsinogene Substanz, während M. Schiff[3]), welcher schon früher gelegentlich Beobachtungen in gleicher Richtung gemacht, aber zum Teil anders gedeutet hatte, später den Namen Propepsin in Vorschlag brachte.

Um die Kenntnis des Propepsins haben sich dann J. N. Langley[4]) und E. S. Edkins[5]), um jene des Prochymosins, der Vorstufe des Labs, Lörcher[6]) Verdienste erworben.

Langley[4]) fand in verdünnten 0,5 bis 1 proz. Natriumkarbonatlösungen ein Mittel, Pepsin und Propepsin zu trennen, da diese Lösungen das Ferment rasch zerstören, das Proferment aber nahezu intakt lassen. Langley und Edkins[5]) stellten weiter den zeitlichen Verlauf dieser zerstörenden Wirkung, andererseits die Behinderung der Sodawirkung durch Pepton fest. Sie fanden ferner,

dafs Propepsin ebenso wie Pepsin durch eine Temperatur von 55 bis 58° zerstört wird, dafs die Überführung von Propepsin in Pepsin durch sehr verdünnte Salzsäure zumeist sehr rasch erfolgt, dafs ferner Durchleiten von Kohlensäure (beim Froschzymogen) die Überführbarkeit in Pepsin vernichtet. Kohlenoxydgas fanden sie unwirksam, während Wasserstoffsuperoxyd die Wirksamkeit von Pepsinogen und Pepsin etwas schädigte. Podwyssotzki[7]) beobachtete, dafs sich aus der sich selbst überlassenen Schleimhaut mehr Pepsin ausziehen läfst als aus der frischen, und dafs Alkoholbehandlung die Ausbeute sehr vermindert. Kohlensäure und Wasserstoffgas übten auf die Profermentlösungen keinen Einflufs, hingegen hatte Sauerstoffdurchleitung eine begünstigende Wirkung auf die Umwandlung des Propepsins in Pepsin. Er hält dieselbe daher für einen oxydativen Vorgang — doch wird dieser Befund Podwyssotzkis von Langley und Edkins[5]) ernstlich bestritten.

Langley[4]) hat sein Sodaverfahren auch für die Untersuchung des Prochymosins brauchbar gefunden. Schwach alkalische Lösungen zerstören nach seinen Erfahrungen das Lab rasch, indess sie das Proferment nur langsam angreifen. Er benutzt daher verdünnte Sodalösung zur Extraktion des letzteren. Lörcher[6]) hat dann die Eigenschaften des Prochymosins eingehender verfolgt. Er untersuchte die Einwirkung von Säuren, Salzen, Alkalien auf Lab und Labzymogen und widerlegte die Aktivierung des Profermentes durch Calciumchlorid, wie sie Boas[8]) und Klemperer[9]) angenommen hatten. Er stellte ferner fest, dafs bei Anwendung von äquimolekularen, $^1/_5$-normalen Lösungen die Salzsäure am raschesten Prochymosin in Lab überführt, dann folgten in absteigender Reihe: Schwefelsäure, Salpetersäure, Essigsäure, Phosphorsäure. Er konnte endlich zeigen, dafs Prochymosin gegen Erhitzen etwas weniger empfindlich ist als Lab, insofern als beim Erhitzen auf 70° ein Teil des Prochymosins der Zerstörung entging, während Lab gänzlich unwirksam wurde.

Aus den angeführten Litteraturangaben geht hervor, dafs man über Natur und nähere Eigenschaften der Profermente, obgleich sie für die Gewinnung (und Charakterisierung) der daraus entstehenden Fermente aufserordentlich wichtig sind, noch wenig unterrichtet ist. Wäre man im stande, Näheres über die chemische Natur der Vorstufen zu erfahren und einfache Methoden zu ihrer Isolierung aufzufinden, so unterläge auch die Erforschung der durch Säurespaltung oder auf anderem Wege daraus erhältlichen Fermente viel geringeren Schwierigkeiten als jetzt. Da ferner

das Vorkommen von Zymogenen, aus welchen erst durch ein hinzukommendes Agens das Ferment gebildet wird, ziemlich allgemein verbreitet zu sein scheint — hat doch Heidenhain[10]) ein solches auch für das Trypsin, Goldschmidt[11]) eines für das Ptyalin nachweisen können, und auch für die Enzyme der Pflanzen liegen ähnliche Angaben vor — so schien es nicht unfruchtbar, auf eine genauere Charakterisierung dieser eigentümlichen Stoffe auszugehen. Wichtig erschien vor allem die Auffindung eines verläfslichen Verfahrens zur Trennung der Profermente von Eiweifs, den fertigen Fermenten und von einander, sodann die Feststellung ihrer wesentlichen Eigenschaften in physikalischer und chemischer Richtung.

1. Trennung der Profermente von den bereits gebildeten Fermenten.

Für die Darstellung von Profermentlösungen kommen vor allem drei Faktoren in Betracht: das Extraktionsmittel, die Reaktion und endlich das benutzte Antisepticum.

Die Art der Extraktionsflüssigkeit war bei den einschlägigen Untersuchungen je nach der Natur des zu extrahierenden Fermentes verschieden. Zur Herstellung von Pepsin- und Lablösungen ging man meist von dem von v. Wittich[12]) empfohlenen wasserhaltigen Glycerin aus. Freilich gehen dabei die Fermente vorwiegend nur in das Wasser der Lösung über, da das wasserfreie Glycerin, wie ich nachweisen konnte, erheblich weniger Ferment und Proferment aufnimmt, und die Vorzüge des Glycerinextraktes gegenüber dem wässerigen Extrakt lediglich auf der schwach antiseptischen Wirkung des ersteren zu beruhen scheinen. Ich habe daher bei der Darstellung meiner Profermentlösungen das Glycerin vermieden. Dafs wässerige Auszüge an Ferment reicher sind als Glycerinextrakte, ist übrigens schon von Langley[4]) und Podwyssotzki[7]) gezeigt worden.

Um von vornherein die Beimengung von Fermenten zu vermeiden, benutzte ich nach dem Vorgange von Langley[4]) sehr verdünnte Sodalösung. Als Antisepticum wurde in Anbetracht der guten Erfahrungen, die im hiesigen Institut mit dem Toluol gemacht worden waren, dieses angewendet.

Als Material dienten ausschliefslich Schweinemagen, einmal wegen der leichten Beschaffbarkeit, ferner wegen ihres aufserordentlichen Fermentreichtums. Ist ja nach Petit[13]) der Schweinemagen überhaupt am reichsten an Pepsin.

Die Schweinemagen wurden mit Wasser abgespült und sorg-

fältig von Schleim und Nahrungsresten befreit. Dann wurde die Schleimhaut des Fundusteiles von der Muskulatur abpräpariert, nochmals mit fliefsendem Wasser mehrere Stunden lang gewaschen, dann mittels der Fleischhackmaschine zu feinem Brei zerhackt. Der Schleimhautbrei wurde abgewogen, mit der doppelten Gewichtsmenge destillierten Wassers und mit Natriumkarbonatlösung bis zu deutlich alkalischer Reaktion versetzt. Nach Zusatz von Toluol, welches sich nur in geringem Mafse löst, dafür aber die Oberfläche bedeckt und gegen das Eindringen von Keimen schützt, wurde das Standgefäfs geschlossen und nach wiederholtem, gelegentlich auch nach mehrstündigem Umschütteln in der durch einen Heifsluftmotor betriebenen Schüttelmaschine in das auf 40° C. temperierte Sandbad gestellt. Hier blieb die Flüssigkeit 3 bis 4 Wochen. Während dieser Zeit trübte sich die vordem klare Flüssigkeit, das Gewebe zeigte zunehmenden Zerfall und die Profermente gingen reichlich in Lösung. Der ganze Vorgang ist der für die Leber jüngst durch M. Jakoby[14]) näher untersuchten Autolyse zu vergleichen, bei welcher die zelligen Elemente durch Einwirkung eines proteolytischen Fermentes zerfallen und ihre sonst wenig zugänglichen kolloiden Bestandteile und Einschlüsse nach aufsen gelangen lassen. Dafs auch hier eine analoge Selbstverdauung vorlag, wird durch das Auftreten der Tryptophanreaktion in der Lösung wahrscheinlich gemacht.

Dafs bei dieser Digestion das Lab zerstört worden ist, kann ohne weiteres gezeigt werden. Die Lösung äufsert nach dem Neutralisieren nicht die geringste Wirkung auf Milch. Dafs aber auch das vorgebildete Pepsin zerstört ist, ist durch Kontrollversuche sichergestellt, da, wie schon Hammarsten und Langley gezeigt haben und ich mich oft überzeugen konnte (s. übrigens auch unten), Pepsin unter den gegebenen Bedingungen spätestens nach einer Stunde völlig unwirksam wird.

Der so erhaltene, filtrierte Schleimhautauszug war deutlich alkalisch und zeigte beim Kochen, bei Zusatz von Salpetersäure und bei anderen Eiweifsreaktionen einen erheblichen Eiweifsgehalt. Daneben war ein mucinähnlicher, in Alkali löslicher, durch Essigsäure in der Kälte fällbarer, nicht im Überschusse von Essigsäure, wohl aber von Salzsäure löslicher Körper vorhanden. Versetzte man mit gesättigter Ammonsulfatlösung, so begann etwa bei Halbsättigung ein dickflockiger Niederschlag auszufallen, der sich bei Mehrzusatz sichtlich verstärkte und bei 3- bis 4fachem Volumen Ammonsulfat noch dichter wurde: beim Verdünnen mit Wasser

löste sich der Niederschlag wieder vollständig, beim Kochen ballte er sich zusammen und war dann im Wasser unlöslich.

Biuret-, Schwefelblei-, Molischs und Millons Probe waren positiv. Die Flüssigkeit reducierte an sich nicht alkalische Kupfer lösung, wohl aber nach kurzem Kochen mit konzentrierter Salzsäure

Behufs Prüfung auf Profermente wurde folgendermafsen vorgegangen: 0,5 ccm der Lösung wurden mit dem gleichen Volumen einer $^1/_5$-Normalsalzsäurelösung versetzt und 15 Minuten auf dem Wasserbad bei 40° C. erwärmt. Zur Untersuchung auf Lab wurde dann die Probe mit $^1/_5$-Normalnatronlauge genau neutralisiert, mit 5 ccm Milch versetzt, neuerdings in das auf 40° C. erwärmte Wasserbad gebracht und der Eintritt der Milchgerinnung beobachtet.

Die Zeit von 15 Minuten mufs allerdings bei der Säurespaltung nicht eingehalten werden; es genügt viel weniger, wie durch Versuche sichergestellt werden konnte, um sämtliches vorhandenes Prochymosin zu aktivieren. Versetzt man z. B. eine Lablösung, die durch 5 Minuten dauernde Einwirkung von Säure gewonnen wurde, mit Natriumkarbonat bis zu deutlich alkalischer Reaktion, so kann man durch nochmaliges Ansäuern und nachträgliches Neutralisieren keine Milchgerinnung mehr erzeugen, da die kurze Einwirkung des Natriumkarbonats in der Wärme zur Zerstörung des Fermentes genügt.

Bei der Untersuchung auf Pepsinogen wurde wiederum 0,5 ccm Magenextrakt mit der gleichen Menge $^1/_5$-Normalsalzsäure versetzt und 15 Minuten im Wasserbade bei 40° C. gehalten. Dann wurde eine Fibrinflocke hinzugefügt und deren Lösung beobachtet.

Zur annähernden quantitativen Labbestimmung bediente ich mich der Verdünnung, d. h. es wurde festgestellt, wie stark die erhaltene Lösung verdünnt werden konnte, um in erwärmter Milch in mindestens 30 Minuten typische Koagulation zu erzeugen. Im Durchschnitt konnte in den filtrierten Magenauszügen ein Labgehalt von 1:1000 erhalten werden, d. h. 1 ccm hätte hingereicht, um 1 Liter Milch in 30 Minuten zur typischen Gerinnung zu bringen.

Für die Untersuchung auf Pepsingehalt bediente ich mich des Verfahrens von Mett [(Mett[15]), Samoiloff[15]), J. Schütz[16])]. In den filtrierten Rohauszügen war nach der Säurebehandlung gewöhnlich so viel Pepsin vorhanden, dafs 1 ccm der Flüssigkeit eine Eiweifssäule von 6 mm Länge in 6 bis 12 Stunden verdaute.

Um über die Wirkung des Pepsins in kürzerer Zeit unterrichtet zu sein, verwandte ich statt des schwer angreifbaren Eiereiweifses namentlich bei verdünnten Pepsinlösungen und bei der quantitativen Bestimmung im Magensaft von Menschen und Hunden Pferdeblutserum, welches in Glasröhren von 2 bis 3 mm Durchmesser bei 85° koaguliert

war. Dasselbe wird von Pepsin viel rascher verdaut als das Eiereiweifs und daher auch von pepsinarmen Flüssigkeiten, wie sie z. B. regelmäfsig bei klinischer Untersuchung gewonnen werden. Ich halte diese Methode der relativen quantitativen Pepsinbestimmung auch für klinische Zwecke für brauchbar und behalte mir vor, anderen Ortes über einschlägige Versuche zu berichten.

2. Trennung der Profermente vom Eiweifs.

Da der erhaltene Magenauszug sehr reich an Profermenten war, aber aufserdem einen reichlichen Gehalt an Proteïnstoffen aufwies, so galt es zunächst, die Profermente vom Eiweifs zu befreien und dann voneinander zu isolieren. Dabei erwies sich nach mehrfachen Vorversuchen folgendes Verfahren als zweckmäfsig: Der alkalische Auszug wurde filtriert, mit Kochsalz bis zu einem Gehalt von 1 Proz., dann mit so viel verdünnter Essigsäure versetzt, dafs ein flockiger Niederschlag, zum gröfsten Teil aus Mucin bestehend, ausfiel. (Essigsäure vermag, wie später ausgeführt werden soll, bei starker Verdünnung die Profermente, zumal in der Kälte, nicht in Fermente überzuführen*).) Der Niederschlag wurde abfiltriert. Er war frei von Proferment. Das Filtrat wurde mit Natronlauge oder Natriumkarbonat genau neutralisiert, mit einem Überschufs von Natriumcarbonat eben schwach alkalisch gemacht und dann tropfenweise mit verdünnter Uranylacetatlösung versetzt. Es entstand ein voluminöser dickflockiger Niederschlag, der die beiden Profermente enthielt, während sich in der abfiltrierten, klaren Flüssigkeit nur Spuren derselben nachweisen liefsen. Der Niederschlag wurde für gewöhnlich durch Centrifugieren von der Flüssigkeit getrennt und dann mit kleinen Mengen schwach mit Natriumcarbonat alkalisch gemachten Wassers ausgezogen. Die Auszüge, welche die Profermente enthielten, wurden vereinigt und bildeten eine klare, fast eiweifsfreie Lösung.

Uranylacetat wurde gewählt, weil es bei den Untersuchungen von Jacoby[14]) im hiesigen Institut sich als ein vorzügliches Fällungsmittel für Eiweifsstoffe und Fermente bewährt hatte. Es bot für den vorliegenden Fall, wo es sich um die sehr säureempfindlichen Profermente handelte, den Vorteil, schon bei neutraler oder schwach alkalischer Reaktion Eiweifsfällung zu erzielen.

Die gewonnenen Lösungen konnten dann durch nochmaliges Fällen mit Uranylacetat und Ausziehen des gewonnenen Nieder-

*) Es erwies sich als zweckmäfsig, die benötigte Essigsäuremenge in Vorversuchen genau zu ermitteln.

schlages mit sehr verdünnter Sodalösung von noch vorhandenen geringen Eiweifsresten befreit werden. So resultierte eine farblose, wasserhelle Flüssigkeit, die in grofsen Krystallisierschalen bei 40° C. weiter eingeengt wurde.

Nach Einengung z. B. von 1 Liter Flüssigkeit auf 100 ccm zeigte die so erhaltene Profermentlösung folgende Reactionen: konzentrierte Salpetersäure erzeugt schwache Trübung, die beim Kochen verschwindet; Essigsäure erzeugt beim Kochen keine Trübung, Xanthoproteïnreaktion bleibt negativ; Essigsäure-Ferrocyankaliumreaktion: negativ; Biuretreaktion: negativ; Millons Reaktion: negativ; Phosphorwolframsäure: schwacher Niederschlag; Gerbsäure: feine Trübung; absoluter Alkohol (10faches Volumen): negativ; Pikrinsäure: negativ; Molisch's Reaktion: negativ; Quecksilbernitrat: feiner Niederschlag; Sublimat: feiner Niederschlag.

Die angeführten Eiweifsproben ergeben, dafs die Profermentlösung nach üblichem Urteil als frei von echten Eiweifskörpern anzusehen ist. Da die Profermente vorläufig nur durch die katalytische Wirkung der aus ihnen erhältlichen Fermente charakterisiert sind, und da sich nicht entscheiden läfst, ob nicht die Fermentwirkung eine noch empfindlichere Reaktion dieser Stoffe darstellt als die empfindlichsten Eiweifsreaktionen, so kann trotz Ausbleibens so empfindlicher Eiweifsproben, wie es die Millon'sche Reaktion ist, die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dafs die uns hier beschäftigenden Profermente den Eiweifsstoffen angehören oder mit Spuren davon verunreinigt sind, zumal, wie ich erwähnen will, der geringe Rückstand sehr wirksamer Lösungen stets stickstoffhaltig war und beim Verbrennen einen ähnlichen Geruch wie verbrennende Eiweifsstoffe zeigte. In einem Falle habe ich Fermentwirkung und Stickstoffgehalt einer solchen Profermentlösung bestimmt.

Nach Behandlung mit Säure zeigte die Lösung eine Labwirkung 1:5000, das heifst 1 ccm vermochte in 30 Minuten 5000 ccm vorgewärmte Milch in ein festes Koagulum zu verwandeln und war im stande, in 6 Stunden 7 mm einer Eiereiweifssäule zu lösen.

Der Gehalt an Stickstoff betrug in der Profermentlösung 0,044 Proz., Schwefel und Phosphor waren in Spuren vorhanden, aber nicht quantitativ bestimmbar. Der gefundene Stickstoffgehalt würde, auf Eiweifs bezogen, die Anwesenheit von über 0,2 Proz. anzeigen, in welchem Falle aber die Eiweifsreaktionen ganz augenfällig sein müfsten! Dieser Stickstoffgehalt mufs daher zum gröfseren Teil entweder den Profermenten als solchen oder nicht eiweifsartigen Beimengungen zukommen.

Nun hat Sundberg[17]) bereits eine Pepsinlösung dargestellt, welche nur durch Alkohol, aber nicht mit den sonst empfindlichsten Eiweifsfällungsmitteln, selbst nicht durch Gerbsäure gefällt wurde. Sodann haben Hammarsten[1]) und Friedberg[18]) Lablösungen in Händen gehabt, die keine Eiweifsreaktionen mehr darboten. Die Eiweifsnatur dieser Fermente und auch der von Jacoby[14]) dargestellten Aldehydase ist somit durchaus zweifelhaft, und man wird mir beistimmen, dafs meine Befunde an den Profermenten eher geeignet sind diese Zweifel zu bestärken als abzuschwächen.

3. Trennung des Propepsins vom Prochymosin.

Was die Trennung der Profermente von einander anbelangt, so lag es nahe, jenen Weg einzuschlagen, welcher von Hammarsten[1]) und anderen behufs getrennter Untersuchung der einzelnen Fermentwirkung bei Anwesenheit eines anderen Ferments gezeigt worden war, nämlich die Zerstörung des einen oder des anderen. Hiergegen sprach aber die Überlegung, dafs die Zerstörung der Wirksamkeit des Proferments nicht mit der Beseitigung davon etwa abstammender inaktiver Produkte identisch ist*). Für meinen Zweck empfahl es sich vielmehr, die Profermente durch Fällungsmittel zu trennen. Nach vielen, fruchtlosen Versuchen gelang es mir, im Uranylphosphat ein geeignetes Trennungsmittel zu finden. Die reine, eiweifsfreie Lösung, die beide Profermente enthielt, wurde nacheinander mit aufeinander eingestellten Lösungen von Uranylacetat und Natriumphosphat versetzt, so dafs ein feinflockiger Niederschlag entstand. Im Filtrat fand sich das Prochymosin, nur mit Spuren von Propepsin verunreinigt, aus dem Niederschlag konnte das Propepsin durch Ausziehen mit schwach alkalischem Wasser, frei von Prochymosin erhalten werden. Was die Wirksamkeit der so gewonnenen Profermentlösungen anbelangt, so konnte, obwohl die Darstellungsweise durchaus nicht eine quantitative Ausbeute giebt, doch erhebliche Fermentwirkung nach dem Aktivieren mit Säure konstatiert werden. So zeigte z. B. die Lösung des Prochymosins nach Säurespaltung eine Wirkung von 1 : 2000, und 1 ccm der Lösung des Propepsins in 0,3 proz. HCl vermochte in sechs Stunden einen Eier eiweifscylinder von 6 mm zu verdauen und löste eine Fibrinflocke in zwei Minuten auf.

*) Vergl. Salkowskis[19]) Bemerkungen über die Reindarstellung des Invertins.

4. Physikalische Eigenschaften der Profermente.

Die physikalischen Eigenschaften der Profermente wurden sowohl am rohen Magenauszug, als an den reinen Profermentlösungen untersucht.

a) Verhalten gegen Temperaturerhöhung.

Dafs das Prochymosin gegen das Erhitzen resistenter ist als das Chymosin, ist seit Langley[4]), Boas[8]) und Lörcher[6]) bekannt. Über die Gröfse der Verschiedenheit aber gehen die Ansichten auseinander. Das erklärt sich aus der Art des untersuchten Materials. Über die Resistenz des Propepsins gegen Temperaturerhöhung ist nichts bekannt.

Von Einflufs ist:

1. Die Dauer des Erhitzens.

Die Versuche wurden so angestellt, dafs eine bestimmte Menge der Profermentlösung auf die gewünschte Temperatur gebracht, dann abgekühlt, mit Säure behandelt und (beim Lab nach vorheriger Neutralisation) bezüglich ihrer Wirkung geprüft wurde.

	Lab-wirkung	Pepsin-wirkung
Versuch I.		
Probe a) und b): 5 Min. lang auf 100° und 90° erhitzt	fehlt	fehlt
Probe c), d), e), f), g): 5 Min. lang auf 80°, 70°, 60°, 50°, 40° erhitzt	vorhanden	vorhanden
Versuch II.		
Probe a), b): 10 Min. lang auf 100°, 90° erhitzt	fehlt	fehlt
Probe c): 10 Min. lang auf 80° erhitzt	fehlt	schwach
Probe d), e), f): 10 Min. lang auf 70°, 60°, 50° erhitzt	vorhanden	vorhanden
Versuch III.		
Probe a) und b): ½ Stunde erhitzt auf 100° und 90°	fehlt	fehlt
Probe c) und d): ½ Stunde erhitzt auf 80° und 70°	fehlt	Spur ?
Probe e), f), g): ½ Stunde erhitzt auf 60° und 50°	vorhanden	vorhanden

2. Die Reaktion.

Es wurden Temperaturversuche mit schwach alkalischem, schwach saurem und neutralem Magenauszug angestellt. Die Prüfung auf Erhaltenbleiben der Fermentwirkung geschah wie oben.

	Lab-wirkung	Pepsin-wirkung
Versuch I. Neutraler Magenauszug.		
Probe a): 5 Min. erhitzt auf 80°	fehlt	fehlt
Probe b): 5 Min. erhitzt auf 70°	Spur?	Spur?
Probe c), d), e): 5 Min. erhitzt auf 60°, 50°, 40°	vorhanden	vorhanden
Versuch II. Alkalischer Magenauszug (1 Proz. Natriumkarbonat).		
Probe a) und b): 5 Min. erhitzt auf 80° und 70°	fehlt	fehlt
Probe c), d), e): 5 Min. erhitzt auf 60°, 50°, 40°	vorhanden	vorhanden
Versuch III. Saurer Magenauszug (0,3 proz. HCl)		
Probe a): 5 Min. erhitzt auf 80°	Spur	vorhanden
Probe b), c), d), e): 5 Min. erhitzt auf 70°, 60°, 50°, 40°	vorhanden	vorhanden

3. Die Gegenwart von Eiweifskörpern.

	Lab-wirkung	Pepsin-wirkung
Versuch I. Rohextrakt.		
Probe a): 5 Min. erhitzt auf 80°	fehlt	Spur?
Probe b), c), d), e): 5 Min. erhitzt auf 70°, 60°, 50°, 40°	vorhanden	vorhanden
Versuch II. Gereinigte Profermentlösung.		
Probe a) und b): 5 Min. erhitzt auf 80° und 70°	fehlt	fehlt
Probe c): 5 Min. erhitzt auf 60°	Spur	Spur
Probe d): 5 Min. erhitzt auf 50°	Spur	vorhanden
Probe e): 5 Min. erhitzt auf 40°	vorhanden	vorhanden
Versuch III. Gereinigte Profermentlösung nach Hinzufügung des gleichen Volumens neutralisierten Eierklars.		
Probe a): 5 Min. erhitzt auf 80°	fehlt	Spur
Probe b), c), d), e): 5 Min. erhitzt auf 70°, 60°, 50°, 40°	vorhanden	vorhanden

Aus diesen Versuchen geht hervor, dafs die Resistenz der Profermente gegen erhöhte Temperatur, wie jene der Fermente selbst, von verschiedenen Bedingungen abhängig ist. Um sie zu zerstören, richtiger: unfähig zu machen, mit Säure Ferment abzuspalten, genügt eine um so geringere Temperaturerhöhung, je länger sie einwirkt, und je alkalischer und je eiweifsärmer die Lösung ist. Es geht hieraus hervor, dafs sich ein absoluter, für alle Fälle gültiger Wert für die Inaktivierungstemperatur nicht angeben läfst.

Doch liegt derselbe bei ungünstigen Bedingungen — Abwesenheit von Eiweifs und schwach alkalischer durch Natriumkarbonat bedingter Reaktion — für beide Profermente zwischen 60° und 70° C. Dafs die schädigende Wirkung bei neutraler Reaktion weniger zu Tage tritt als bei alkalischer, beim Prochymosin, weniger bei saurer als bei neutraler (denn die entsprechenden Säureversuche mit Propepsin können keinen Aufschlufs geben, da sich dabei das Propepsin natürlich schnell in Pepsin umwandelt), entspricht der physiologischen Thatsache, dafs die in Rede stehenden Profermente normalerweise im Magen durch Säurewirkung aktiv gemacht werden. Dafs vorhandene Eiweifsstoffe den Profermenten gegenüber eine Art Schutzwirkung zeigen, findet vielleicht ein Seitenstück in dem von Langley und Edkins[5]) geführten Nachweis, dafs Anwesenheit von Eiweifs die zerstörende Wirkung des Natriumkarbonats vermindert.

Gegen Temperaturerniedrigung verhalten sich die Profermente indifferent. Man kann ihre Lösungen gefrieren und wieder auftauen lassen, ohne dafs sich der Gehalt daran ändert.

b) Adsorption durch feste Körper.

Eine den Fermenten bekanntlich sehr allgemein zukommende Eigenschaft ist die Fähigkeit, festen Körpern, namentlich wenn sie auf kleinem Raume eine grofse Oberfläche darbieten, anzuhaften.

Dafs auch den Profermenten diese Fähigkeit zukommt, war schon durch die gewählte Darstellungsmethode — Fällung durch Uranylniederschläge — klar geworden.

Da über diese physikalisch sehr interessante und biologisch wahrscheinlich hochwichtige — übrigens auch für die Technik der Darstellung von Profermenten und Fermenten mafsgebende — Eigenschaft sehr wenig bekannt ist, so habe ich eine Anzahl einschlägiger Versuche angestellt:

1. mit pulverförmigem Material, teils mineralischer, teils organischer Natur;
2. mit in der Flüssigkeit selbst erzeugten Niederschlägen;
3. mit Fibrin.

Die betreffenden Substanzen wurden eine halbe Stunde mit der Profermentlösung geschüttelt, dann wurde filtriert und das Filtrat, eventuell auch der Niederschlag, durch Säurebehandlung in eingangs angegebener Weise auf Proferment untersucht.

ad 1. In Pulverform zugesetzte Niederschläge:

	Filtrat	Niederschlag
a) Glaspulver:		
Labwirkung	vorhanden	fehlt
Pepsinwirkung	„	„
b) Quarzsand:		
Labwirkung	vorhanden	fehlt
Pepsinwirkung	„	„
c) Kieselgur:		
Labwirkung	fehlt	vorhanden
Pepsinwirkung	„	„
d) Thon:		
Labwirkung	vorhanden	fehlt
Pepsinwirkung	„	„
e) Schwerspat:		
Labwirkung	fehlt	vorhanden
Pepsinwirkung	„	„
f) Marmor (fein gepulvert):		
Labwirkung	fehlt	vorhanden
Pepsinwirkung	„	„
g) Tierkohle:		
Labwirkung	fehlt	vorhanden
Pepsinwirkung	„	„
h) Stärke:		
Labwirkung	vorhanden	fehlt
Pepsinwirkung	„	„
i) Lykopodium:		
Labwirkung	vorhanden	fehlt
Pepsinwirkung	fehlt	vorhanden

ad 2. In der Profermentlösung wurden Niederschläge durch zwei aufeinander einwirkende Salze erzeugt. Dabei kam in Betracht, dafs die Filtrate nicht sauer reagieren, und dafs die verwendeten Salze nicht selbst eine Ausfällung des Kaseins der Milch hervorrufen durften. Ferner mufsten sie für die Profermente unschädlich sein.

a) Baryumchlorid und Magnesiumsulfat: Im Filtrat kein Proferment (Magnesiumchlorid erweist sich als indifferent gegen die Profermente).

b) Calciumchlorid und Magnesiumsulfat: Im Filtrat kein Proferment.

c) Calciumchlorid und Natriumphosphat: Im Filtrat kein Proferment.

ad 3. Fibrin wurde zu einer Pepsinogenlösung zugesetzt und 24 Stunden darin belassen; nach dieser Zeit wurde es entnommen, wiederholt ausgewaschen und mit 0,3proz. Salzsäurelösung versetzt, es löste sich innerhalb weniger Minuten vollständig auf, während die Lösung, in der es gelegen war, an verdauender Kraft eingebüfst hatte, wie ein Kontrollversuch zeigte. Folglich wird nicht nur das Pepsin, wie v. Wittich[12]) gezeigt hatte, sondern auch seine Vorstufe vom Fibrin adsorbiert.

Trotz ihrer Unvollkommenheit geben die vorliegenden Versuche doch einige beachtenswerte Resultate. Zunächst fällt auf, dafs anscheinend fein verteilte, in der Flüssigkeit erzeugte Niederschläge, welcher Art immer, die Profermente niederschlagen. Es ist interessant, die an den zugehörigen Fermenten beobachteten analogen Thatsachen daneben zu stellen:

Pepsin wird unter anderem mitgerissen von fein verteilter Kohle, Schmirgel, Ziegelsteinpulver (v. Heltzl), durch Niederschläge von Calciumtriphosphat, Cholesterin (Brücke[20]), Magnesiumkarbonat (Hammarsten[1]). Lab wird mitgerissen durch frisch erzeugte Niederschläge von Magnesiumkarbonat (Hammarsten[1]) (unvollständig), Palmitin-, Stearinsäure (Hammarsten[1]), nicht durch Blei- und Kupferniederschläge (Meyer[23]).

Wichtiger für eine eventuelle Verwertung scheinen mir die in der ersten Versuchsreihe angeführten Daten. Hier tritt eine Verschiedenheit der pulverförmigen Stoffe in betreff ihrer Adsorptionsfähigkeit zu Tage, die sich anscheinend nicht durch mechanische oder physikalisch-chemische Eigenschaften erklären läfst. Einzelne Thatsachen, wie das ungleiche Verhalten von Lykopodiumpulver gegen beide Profermente, das Anhaften derselben an Kieselgur, aber nicht an Stärke, Thon und Quarzsand weisen ganz direkt auf specifische Beziehungen zwischen der adsorbierenden Fläche der festen Körper und den Profermenten hin.

c) Osmotisches Verhalten.

Es wurde sowohl der rohe Magenauszug, als auch gereinigte Profermentlösung gegen Wasser dialysiert; als Dialysator dienten

Pergamentschläuche für grofse Mengen, Schilfschläuche*) für kleine Mengen.

Das Resultat der Untersuchung war, dafs die Profermente die Schlauchwand nicht passieren, dafs sie aber bei lange dauernder (dreiwöchiger) Dialyse zu Grunde gehen.

Dauer der Dialyse	Dialysierwasser		Schlauchinhalt	
	Lab-wirkung	Pepsin-wirkung	Lab-wirkung	Pepsin-wirkung
Versuch I. Magenauszug.				
1. Tag	fehlt	fehlt	vorhanden	vorhanden
2. Tag	fehlt	fehlt	vorhanden	vorhanden
3. Tag	fehlt	fehlt	vorhanden	vorhanden
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
20. Tag	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt
Versuch II.				
1. Tag	fehlt	fehlt	vorhanden	vorhanden
2. Tag	fehlt	fehlt	vorhanden	vorhanden
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
.		.	.	.
.	.	.	.	.
.	.	.	.	.
20. Tag	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt

Filtration durch Porzellan- und Thonfilter.

Seit v. Freudenreich[21]) die Filtration von Lablösungen durch Chamberland-Kerzen empfohlen hat, ist diese Eigenschaft des Labs, durch das Porzellanfilter zu gehen, vielfach zur Reinigung und Sterilisation der Fermentlösungen verwendet worden. Es wurden nun Versuche mit ungereinigten und reinen Profermentlösungen angestellt und dazu sowohl Chamberland-Kerzen als Filter von Kitasato verwendet. Regelmäfsig ergab sich, dafs die Profermente die Wand passierten, jedoch nur zum kleinsten Teil.

*) Über die Verwendbarkeit dieser von Phragmites communis stammenden Membranen zu osmotischen Versuchen sind im hiesigen Institut Versuche angestellt worden, über die demnächst berichtet werden soll.

Prochymosin scheint im ganzen die Kerzenwand schwerer zu durchdringen als Propepsin.

d) Optisches Verhalten.

Bei den wiederholt unternommenen Prüfungen auf optisches Drehungsvermögen eiweifsfreier Lösungen*) konnte jedesmal eine geringe Drehung nach links beobachtet werden. Die Gröfse der Drehung (beim 2 dm-Rohr) schwankte zwischen 0,15 und 0,25°.

5. Resistenz der Profermente gegen chemische Agentien.

a) Verhalten gegen Alkalien.

1. Verhalten gegen freies Alkali.

Dafs freies Alkali schon in geringem Überschusse die Magenfermente zerstört, wurde für das Pepsin von Langley[4]), für das Lab von Hammarsten[1]) sichergestellt. Das Verhalten der Zymogene ist von Langley[4]) bezüglich des Propepsins, von Boas[3]) bezüglich des Prochymosins genauer studiert worden. Während nach Langley schon ein Überschufs von 0,0025 Proz. Alkali genügt, um das Propepsin zu zerstören, findet Boas das Prochymosin viel resistenter gegen kaustisches Alkali als das Ferment.

Lörcher[6]) konnte beim Labferment und Prochymosin einen Unterschied im Verhalten gegen kaustisches Alkali nicht finden. Alle diese Untersuchungen wurden an rohen Magenauszügen ausgeführt. Meine Untersuchungen beziehen sich auf eiweifsfreie Lösungen.

Dabei wurde die Lösung mit Alkali versetzt, eine bestimmte Zeit lang stehen gelassen, neutralisiert und mit Säure aktiviert.

Dauer der Einwirkung	4fach-Normal-Natronlauge	Menge der Lösung	Wasser	Alkaligehalt der Gesamtflüssigkeit	Labwirkung	Pepsinwirkung
15 Min.	4 ccm	2 ccm	2 ccm	2fach-Norm.	fehlt	fehlt
15 „	2 „	2 „	4 „	Normal	fehlt	fehlt
15 „	1 „	2 „	5 „	$^1/_2$-Normal	fehlt	fehlt
15 „	0,5 „	2 „	5,5 „	$^1/_4$-Normal	fehlt	fehlt
15 „	0,25 „	2 „	5,75 „	$^1/_8$-Normal	Gerinnung nach 1 Stunde	Verdaut nach 4 Stunden

*) Das heifst Lösungen, welche keine typischen Eiweifsreaktionen darboten.

Freies Alkali zerstört sonach das Prochymosin und Propepsin schon bei geringer Konzentration. Ein Unterschied zwischen Ferment und Proferment im Verhalten gegen kaustisches Alkali ist nicht nachzuweisen.

2. Verhalten gegen Ammoniak.

Versuchsanordnung und Ergebnis wie vorhin. Beide Profermente werden durch Ammoniak schon beim Vorhandensein von Spuren desselben zerstört.

3. Verhalten gegen Natriumkarbonat.

Die gröfsere Resistenz des Proferments gegen verdünnte Sodalösungen gegenüber dem Ferment wurde zuerst von Langley betont; derselbe giebt an, dafs das Proferment langsamer durch Soda zerstört werde, dafs aber ein Gehalt von 0,5 bis 1 Proz. genüge, um es zu vernichten.

Versuchsanordnung wie oben:

Dauer der Einwirkung	$^1/_2$-Norm.-Na_2CO_3	Proferment-lösung	Wasser	Sodagehalt der Probe	Labwirkung	Pepsinwirkung
12 Stunden	3 ccm	1 ccm	—	$^3/_8$-Normal	sofort	10 Min.
12 „	2 „	1 „	1 ccm	$^1/_4$-Normal	sofort	10 „
12 „	1 „	1 „	2 „	$^1/_8$-Normal	sofort	10 „

Soda vermag somit in den angeführten Konzentrationen die Profermente nicht zu zerstören.

b) Verhalten gegen Säuren.

Nur das Prochymosin ist in bequemer Weise der Prüfung auf Säureresistenz zugänglich, da hier die Prüfung auf gebildetes Ferment bei neutraler Reaktion vorgenommen wird. Beim Propepsin, wo auf entstandenes Pepsin nur in saurer Lösung geprüft werden kann, ist natürlich dieses Verfahren ausgeschlossen. Man kann hier jedoch den umgekehrten Weg einschlagen und die relative Resistenz des Proferments gegen Natriumkarbonat zu gleichem Zwecke benutzen, indem man erst Säure einwirken läfst, dann mit einer für das Proferment unschädlichen Sodalösung in der Wärme das gebildete Pepsin unwirksam macht und nun neuerlich mit Säure digeriert. Soweit das Propepsin bereits bei der ersten Säurebehandlung aktiviert ist, geht es bei der Sodabehandlung zu Grunde, so dafs durch die zweite Säureeinwirkung nur der unveränderte Rest des Proferments zur Wirkung gelangt.

α) Versuche mit Prochymosin:

Die Versuchsanordnung war jedesmal die, dafs 1 ccm der reinen Profermentlösung mit dem gleichen Volumen der Säure versetzt wurde, so dafs $^1/_{10}$-Normalsäure resultierte; die Einwirkung der Säure auf das Proferment fand bei 40° C. statt.

Säure	Dauer der Einwirkung	Labwirkung beim Zusammenbringen mit vorgewärmter Milch erfolgt
I. Versuch:		
$^1/_5$-Normal-HCl	30 Secunden	sofort
„ -HNO_3	30 „	nach 2 Minuten
„ -H_2SO_4	30 „	„ 3 „
„ -$C_3H_6O_3$	30 „	bleibt aus
„ -$C_2H_4O_2$	30 „	„
„ -H_3PO_4	30 „	„
II. Versuch:		
$^1/_5$-Normal-HCl	1 Minute	sofort
„ -HNO_3	1 „	nach 1 Minute
„ -H_2SO_4	1 „	„ 2 Minuten
„ -$C_3H_6O_3$	1 „	bleibt aus
„ -$C_2H_4O_2$	1 „	„
„ -H_3PO_4	1 „	„
III. Versuch:		
$^1/_5$-Normal-HCl	5 Minuten	sofort
„ -HNO_3	5 „	„
„ -H_2SO_4	5 „	nach 1 Minute
„ -$C_3H_6O_3$	5 „	bleibt aus
„ -$C_2H_4O_2$	5 „	„
„ -H_3PO_4	5 „	„
IV. Versuch:		
$^1/_5$-Normal-HCl	15 Minuten	sofort
„ -HNO_3	15 „	„
„ -H_2SO_4	15 „	„
„ -$C_3H_6O_3$	15 „	nach 5 Minuten
„ -$C_2H_4O_2$	15 „	bleibt aus
„ -H_3PO_4	15 „	„
V. Versuch:		
$^1/_5$-Normal-HCl	30 Minuten	sofort
„ -HNO_3	30 „	„
„ -H_2SO_4	30 „	„
„ -$C_3H_6O_3$	30 „	„
„ -$C_2H_4O_2$	30 „	nach 2 Stunden
„ -H_3PO_4	30 „	bleibt aus

Es folgt daraus, dafs die Aktivierung des Prochymosins durch Säure äufserst rasch erfolgt. Die Reihenfolge der untersuchten äquimolekularen Säuremengen bezüglich der Aktivierungskraft für das Zymogen des Labs war: Salzsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, Milchsäure, Essigsäure, Phosphorsäure, was die einschlägigen Angaben Lörchers[6]) zum Teil bestätigt.

β) Versuch mit Propepsin:

Die Art der Prüfung auf Säureresistenz ist oben angegeben worden. Die Reihenfolge der verschiedenen Säuren in Bezug auf die Überführung von Propepsin in Pepsin ergab sich wie folgt: Salzsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Essigsäure und Milchsäure.

c) Verhalten gegen Neutralsalze.

Im Hinblick auf die von Ebstein und Grützner[2]) und von Heidenhain[22]) gehegte Vorstellung, dafs auch Kochsalzlösung die Profermente zu aktivieren vermag, habe ich folgende Versuche angestellt.

1. Propepsin.

2 ccm einer Propepsinlösung wurden mit dem gleichen Volumen einprozentiger Kochsalzlösung versetzt und eine Stunde bei 40° C. stehen lassen, nach dieser Zeit wurde mit schwacher Sodalösung das etwa entstandene Pepsin zerstört und mit Säure der Gehalt an Proferment festgestellt. Eine Kontrollprobe mit Profermentlösung ohne Kochsalzeinwirkung zeigte keine stärkere verdauende Kraft als die nach Behandlung mit Kochsalzlösung.

Daraus folgt, dafs einprozentige Kochsalzlösung das Proferment nicht zu aktivieren vermag.

2. Prochymosin.

2 ccm reiner Prochymosinlösung wurden mit dem gleichen Volumen einprozentiger Kochsalzlösung zusammengebracht und eine Stunde lang bei 40° C. einwirken lassen. Dann wird das Prochymosin aktiviert und die Wirkung auf Milch beobachtet.

Einprozentige Kochsalzlösung schwächt das Prochymosin nicht, wirkt aber auch nicht aktivierend.

d) Verhalten gegen Antiseptica, Sauerstoff und Kohlensäure.

1. Alkohol.

Je 1 ccm der Profermentlösung wurde mit verschiedenen Mengen Alkohol versetzt und eine bestimmte Zeit (24 Stunden) stehen lassen, dann wurde der Alkohol bei 40° abgedunstet und die Flüssigkeit durch Säurewirkung aktiviert. Die Wirksamkeit der erhaltenen Fermentlösung lässt sich nach dem zeitlichen Verlauf ihrer Wirkung beurteilen.

Propepsin	Alkohol (95 proc.)	Wasser	Eine Fibrinflocke wird gelöst
1 ccm	1 ccm	0,0 ccm	nicht
1 „	0,8 „	0,2 „	„
1 „	0,6 „	0,4 „	in 30 Minuten
1 „	0,4 „	0,6 „	„ 25 „
1 „	0,2 „	0,8 „	„ 20 „
1 „	0,0 „	1 „	„ 8 „

Prochymosin	Alkohol	Wasser	Milchgerinnung erfolgt
1 ccm	1 ccm	0,0 ccm	nicht
1 „	0,8 „	0,2 „	„
1 „	0,6 „	0,4 „	„
1 „	0,4 „	0,6 „	„
1 „	0,2 „	0,8 „	nach 20 Minuten
1 „	0,0 „	1 „	„ 2 „

Alkohol zerstört Prochymosin und Propepsin schon in grofser Verdünnung.

2. Äther.

Versuchsanordnung wie oben. Äther zerstört das Prochymosin, nicht das Propepsin.

3. Aceton.

Aceton zerstört das Prochymosin, dagegen das Propepsin nicht.

4. Chloroform zerstört weder Prochymosin noch Propepsin.

5. Toluol zerstört weder Prochymosin noch Propepsin.

6. Formaldehyd zerstört in geringer Konzentration (0,5 bis 1 Proz.) die Profermente nicht, wohl aber bei höherer Konzentration.

7. Sublimat.

Beim Prüfen auf die Widerstandsfähigkeit gegen Sublimat wurde nach der Einwirkung die Lösung auf das 10fache verdünnt, um die Wirkung des Sublimats auf Milch und Fibrin auszuschliefsen, und dann mit Säure behandelt. Durch Kontrollversuche wurde die Wirkung der aufs 10fache verdünnten Sublimatlösung auf die Milchgerinnung resp. die Fibrinverdauung ausgeschlossen.

Sublimat zerstört noch in 0,1proz. Konzentration sowohl Prochymosin als Propepsin.

8. Phenol zerstört noch in 1proz. Konzentration beide Profermente.

9. Benzaldehyd zerstört das Prochymosin, nicht das Propepsin.

10. Chlor, Brom, Jod zerstören beide Profermente.

11. Wasserstoffsuperoxyd (neutralisiert) wurde auf die Profermente eine Stunde lang einwirken lassen, es fand weder Aktivierung noch sonst eine Veränderung der Profermentlösung statt.

Diese Befunde zeigen, dafs sich die Profermente im ganzen gegen die gewählten chemischen Agentien ähnlich verhalten wie die aus ihnen entstehenden Fermente. Bemerkenswert ist die ungleiche Resistenz von Propepsin und Prochymosin gegen einzelne Agentien, so Äther, Aceton, Benzaldehyd, wobei specifische Verschiedenheiten hervortreten. Die Beobachtung, dafs Wasserstoffsuperoxyd keine Wirkung auf sie äufsert, stimmt schlecht mit der einschlägigen Angabe Podwyssotzkis[7]).

12. Sauerstoffdurchleitung durch Profermentlösungen ist vollständig indifferent und ohne aktivierende Wirkung.

Umgekehrt konnte ich auch Langleys[5]) allerdings auf Froschpepsinogen bezügliche Angabe über die zerstörende Wirkung von Kohlensäure bei den mir vorliegenden Pepsinogenlösungen vom Schwein nicht bestätigen. Das ist insofern kein thatsächlicher Widerspruch, als Langley bei Anwendung von Säugetierpepsinogen zum gleichen negativen Resultat kam. Nur hielt es Langley für wahrscheinlich, dafs die Anwesenheit von viel Eiweifs in den Auszügen von Säugetiermagen die Wirkung der Kohlensäure hemme. Ich bemerke aber, dafs ich mit so gut wie eiweifsfreien Lösungen auch kein anderes Resultat erzielt habe.

d) Verhalten gegen Verdauungs-Fermente und Darmsekrete.

Die Einwirkung von im Darm auftretenden Fermenten auf die Profermente des Magens könnte sich im lebenden Tierkörper wohl nur unter pathologischen Verhältnissen, wenn die Salzsäure des Magens fehlt, äufsern. Die nachfolgenden Versuche sollten lehren: 1. wirken die untersuchten Fermente und Sekrete aktivierend auf die Magenfermente oder 2. zerstören sie dieselben? Neben Trypsin, Galle und Duodenumextrakt habe ich zum Vergleich auch Papayotin herangezogen.

1. Trypsin.

1 ccm Propepsinlösung mit 1 ccm gut wirkender (Schuchardt-) Trypsinlösung versetzt wurde 15 Minuten bei 40° C. gehalten. Nach dieser Zeit wurde mit $^1/_5$-Normal-Salzsäure angesäuert und mit Fibrin versetzt. Da das Trypsin in so stark saurer Lösung unwirksam wird, war eine Störung des Versuchs durch seine Anwesenheit ausgeschlossen.

Es ergab sich, dafs das Propepsin durch die Behandlung mit Trypsin zwar gelitten hatte, aber nicht ganz zerstört war.

Bezüglich des Prochymosins konnte ich nicht zu Resultaten kommen, da Trypsinpräparate bekanntlich in einem gewissen Stadium der Wirkung selbst auf Milch koagulierend wirken.

2. Papayotin schädigt Prochymosin und Propepsin, bewirkt keine Aktivierung.

3. Galle.

Native Galle wurde zu Propepsin- und Prochymosinlösungen zugesetzt. Beide Profermente wurden durch die Galle zerstört, eine Aktivierung fand nicht statt.

4. Dünndarmauszug.

Aus Dünndarmmucosa gewonnener Auszug bewirkte eine deutliche Schädigung der Profermente, eine Aktivierung fand nicht statt.

Aus diesen Beispielen geht zur Genüge hervor, dafs die Sekrete der unteren Abschnitte des Darmkanals die Profermente des höhergelegenen Abschnittes: des Magens, unwirksam machen, ähnlich wie das bereits für die Fermente bekannt ist.

Die vorliegenden Untersuchungen über die Profermente des Magens lassen, wenngleich vielfach noch lückenhaft, eine etwas klarere Vorstellung von der Natur derselben gewinnen. Soweit sich aus den zwei untersuchten Beispielen schliefsen läfst, stehen die Profermente den aus ihnen hervorgehenden Fermenten sehr nahe. Es geht das nicht blofs aus deren kolloidaler Natur, Nichtkoagulierbarkeit, der Fähigkeit an festen Stoffen und zwar unter specifischer Auswahl zu haften, ihrer Zerstörbarkeit durch hohe Temperaturen und durch wenig eingreifende chemische Agentien hervor, sondern auch aus dem Umstande, dafs ihre Überführung in Fermente bei Anwendung des geeigneten Mittels, im vorliegenden Falle sehr verdünnter Mineralsäure, in vollem Umfang und mit einer Raschheit erfolgt, welche nur bei einem sehr einfachen und glatt verlaufenden chemischen Prozefs verständlich ist.

Für das physiologische Verständnis ist dieser Befund insofern von Wert, als er zeigt, dafs es bei normaler Salzsäuresekretion für die Verdauungsvorgänge keinen Unterschied macht, ob die Magendrüsen Proferment oder Ferment nach aufsen treten lassen. Nur bei gestörter Säurebildung, einem unter pathologischen Verhältnissen allerdings häufigen Vorkommnis, dürften noch unveränderte Profermente im Mageninnern anzutreffen sein. Was für ein

chemischer Vorgang dieser Umwandlung zu Grunde liegt, kann allerdings zur Zeit höchstens vermutet werden. Da es sich um eine katalytische Wirkung von H-Ionen handelt, dürfte man am ehesten an eine Hydrolyse denken.

Die Vorstellung, dafs die Profermente Eiweifsstoffe mit daran angegliederten Fermentmolekülen darstellen (Grützner[2]), hat in meinen Versuchen keine Stütze gefunden. Vielleicht wird die Frage nach der chemischen Natur der Fermente und Profermente später einmal unter einem gelöst werden, und es scheint mir nicht ausgeschlossen, dafs gerade die Reindarstellung der resistenteren Profermente den Weg zur Lösung dieser Frage bahnen wird.

Litteratur.

[1]) Hammarsten: „Über die Milchgerinnung und die dabei wirkenden Fermente der Magenschleimhaut." Malys Jahresbericht 2 (1872), 118.

[2]) Ebstein und Grützner: „Über Pepsinbildung im Magen." Pflügers Archiv d. ges. Physiologie 8, 122, 617 (1874).

[3]) M. Schiff: „Leçons sur la physiologie de la digestion" 1867, p. 2. M. Schiff: „Archive des scienc. phys. et naturelles 1877."

[4]) J. N. Langley: „On the histology of the mammalian gastric glands and the relation of pepsin to the granules of the chief cells." Journal of Physiology 3, 269 (1881).

J. N. Langley: „Über die Zerstörung von Fermenten im Darmkanal." Journal of Physiology 3, 246 (1881).

[5]) J. N. Langley und Edkins: „Pepsinogen and pepsin." Journal of Physiology 7, 371 (1886).

[6]) Lörcher: „Über Labwirkung." Pflügers Archiv d. ges. Phys. 69, 141.

[7]) Podwyssotzki: „Zur Methodik der Darstellung von Pepsinextrakten." Pflügers Archiv d. ges. Phys. 39, 62.

[8]) Boas: „Untersuchungen über das Labferment und Labzymogen im gesunden und kranken Magen." Zeitschrift für klin. Medizin 14, 249 (1888).

[9]) G. Klemperer: „Die diagnostische Verwertbarkeit des Labferments." Zeitschrift f. klin. Medizin 14, 280 (1888).

[10]) Heidenhain: „Beitrag zur Kenntnis des Pankreas." Pflügers Archiv f. d. ges. Physiologie 10, 557 (1875).

[11]) Goldschmidt: „Zur Frage: Ist im Parotidenspeichel ein Ferment vorgebildet vorhanden oder nicht?" Zeitschrift für physiologische Chemie 10, 273 (1886).

[12]) v. Wittich: „Über eine neue Methode zur Darstellung künstlicher Verdauungsflüssigkeiten." Pflügers Archiv f. d. ges. Physiologie 2, 193 (1869).

[13]) Petit: „Studien über die Verdauungsfermente." Malys Jahresbericht für Tierchemie 10, 308.

[14]) M. Jacoby: „Über das Aldehyde oxydierende Ferment der Leber und Nebenniere." Zeitschrift f. physiol. Chem. 30, 135 (1900).

[15]) Samoiloff: „Die Bestimmung der fermentativen Kraft von pepsinhaltigen Flüssigkeiten nach der Mettschen Methode." Arch. d. scienc. biolog. 2, 698.

[16]) J. Schütz: „Zur Kenntnis der quantitativen Pepsinwirkung." Zeitschrift f. physiol. Chemie 30, 1 (1900).

[17]) Sundberg: „Ein Beitrag zur Kenntnis des Pepsins." Zeitschrift f. physiol. Chemie 9, 319 (1885).

[18]) Friedberg: „Über das wirksame Princip des Labs, das sogenannte Chymosin." Journal of the americ. chem. soc. 1888, p. 15.

[19]) E. Salkowski: „Über das Invertin der Hefe." Zeitschrift f. physiol. Chemie 31, 305 (1900).

[20]) Brücke: „Beiträge zur Lehre von der Verdauung." Sitzungsbericht d. k. Akad. d. Wiss. in Wien 43, 601 (1861).

[21]) v. Freudenreich: „Beitrag zur Kenntnis der Wirkung des Labferments." Centralbl. für Bacter. und Parasitenkunde 2, 4, 309.

[22]) Heidenhain: „Über die Absonderung der Fundusdrüsen." Archiv f. d. ges. Physiol. von Pflüger 19, 148 (1879).

[23]) Ad. Meyer: „Neue Beiträge zur Kenntnis der Wirkung des Labferments." Landw. Versuchsstationen 27, 247.

II.

Über die örtliche Verbreitung der Profermente in der Magenschleimhaut.

Von Dr. **Karl Glaessner** aus Prag.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

Die Frage, ob in einem bestimmten Abschnitt der Verdauungsschleimhaut bestimmte Fermente gebildet werden, ist bis jetzt zum Teil nur deshalb ungenügend beantwortet, weil es an einem sicheren Verfahren fehlte, die am Orte gebildeten Fermente und die von anderswo zugeführten, blofs der Oberfläche anhaftenden zu trennen. Die in der vorangehenden Untersuchung[1]) mitgeteilte Erfahrung, dafs gewisse Profermente, so das Propepsin und das Prochymosin, der Einwirkung toluolhaltigen, von Natriumkarbonat schwach alkalisch reagierenden Wassers bei 35 bis 40° C. monatelang, anscheinend ohne Einbufse, widerstehen, während die zugehörigen Fermente unter gleichen Verhältnissen frühzeitig, schon nach Stunden, ihre Wirksamkeit völlig verlieren, gestattet für bestimmte Fälle eine scharfe Unterscheidung von Proferment und Ferment und ermöglicht damit eine Entscheidung der obigen Frage auf einfachem Wege. Voraussetzung ist: 1. dafs die Profermente durch die Digestion mit ganz schwach alkalischer Salzlösung nicht verändert, d. h. weder zerstört noch aktiviert werden — eine Voraussetzung, die wohl allgemein zutreffen dürfte, da die Profermente in den lebenden Zellen auch von einer solchen Flüssigkeit umspült oder darin gelöst sind; 2. dafs die zugehörigen Fermente durch die angegebene Digestion mit schwach alkalischem Wasser unwirksam werden, was nur für bestimmte Fermente, z. B. für Lab und Pepsin, nicht aber für Trypsin, das proteolytische Ferment der

[1]) Siehe vorstehende Arbeit.

Leber u. s. w. zutrifft; 3. es mufs jenes Agens bekannt sein, welches die Profermente in Fermente überführt — das aktivierende Agens —, um mit dessen Hülfe auf die Anwesenheit der Profermente prüfen zu können; 4. in dem fremden Sekret, welches die zu untersuchende Schleimhautfläche bespült, dürfen nicht selbst Profermente enthalten sein, denn wie ich oben gezeigt habe, haften die Profermente der Oberfläche fester Körper ebenso leicht an wie die fertig gebildeten Fermente, und in diesem Falle wäre eine Unterscheidung, ob sie am Orte selbst entstanden oder zugeschwemmt sind, kaum durchzuführen.

Von den mannigfachen Fragen in der Physiologie der Sekretionen, welche mit Hülfe dieses Prüfungsmodus angegangen werden können, soll im Nachstehenden eine besonders naheliegende erörtert werden: die Beteiligung der Pylorusmucosa an der Bildung der specifischen Magenfermente.

1. Der Anteil der Pylorusschleimhaut an der Pepsinbildung.

Bekanntlich ist die Frage, ob die Pylorusschleimhaut Pepsin und Lab liefert, von den einzelnen Autoren sehr verschieden beantwortet worden.

Seit Wassmann[1]) (1839), welcher zuerst Fundus und Pylorus unterschied, ist es bekannt, dafs Fundusschleimhaut mit Säure infundiert ungleich rascher Eiweifs verdaut als Pylorusschleimhaut. Nach Wassmann läfst sich durch drei- bis viermaliges Waschen mit Wasser Pylorusmucosa pepsinfrei machen, Fundusschleimhaut nicht. Aus diesen Befunden, welche zumeist Bestätigung fanden, entwickelte sich dann die Vorstellung, dafs nur die Fundusdrüsen Pepsin liefern, die peptische Wirkung der Pylorusmucosa aber nur von anhaftendem Fundussekret herrühre.

Das konstante Vorkommen eines in saurer Lösung verdauenden Ferments in der Pylorusschleimhaut wurde zuerst wieder von Ebstein und Grützner[2]) hervorgehoben und mit guten Gründen gegen die entgegengesetzten Angaben v. Wittichs[3]), Wolffhügels[4]), Herrendörfers[5]) und anderer Autoren verteidigt.

[1]) De digestione nonnulla, Berolini, 1839.
[2]) Pflügers Archiv 8, 122, 517.
[3]) Pflügers Archiv 7, 18; 8, 144.
[4]) Pflügers Archiv 7, 188.
[5]) Inaug.-Dissert., Königsberg 1875.

Ebstein und Grützner zeigten, dafs die tiefe, am lebenden Magen von aufsen abgetragene Drüsenschichte des Pylorus, die nie mit Magensaft in Berührung gekommen war, immer Pepsin enthält, auch wenn die zugehörige oberflächliche Schichte und der anhaftende Schleim ganz, oder nahezu ganz, pepsinfrei sind. Sie vermochten ferner nie eine Imbibition der Darmmucosa mit Pepsin zu stande zu bringen, so dafs diese dann das Verhalten der Pylorusschleimhaut gezeigt hätte. Ihre Auffassung fand dann weitere Stützen in dem Befund Langendorffs[1]), dafs die portio pylorica von Rinderembryonen zu einer Zeit pepsinhaltig ist, wo der Magen nur alkalische, pepsinfreie Flüssigkeit enthält, ganz besonders aber in der durch Klemensiewicz[2]) und Heidenhain[3]) sichergestellten Thatsache, dafs ein aus dem Pylorus künstlich gebildeter „Pylorusmagen" monatelang pepsinhaltiges Sekret liefert.

Von diesen Beweisgründen ist der an zweiter Stelle angeführte, wonach es nicht gelingt, die Darmmucosa mit Pepsin zu imbibieren, wohl der schwächste; denn da die Imbibitionsfähigkeit der Gewebe für Fermente so gut wie für Farbstoffe von dem specifischen Selektionsvermögen der Gewebe abhängt, kann ein an der Darmschleimhaut erhaltener Befund nichts für die Pylorusmucosa beweisen, solange nicht die Gleichheit ihres Selektionsvermögens für den betreffenden Fall nachgewiesen ist. Die übrigen Beweisgründe scheinen zunächst unwiderleglich die Anwesenheit von Pepsin zu beweisen. Demgegenüber ist aber folgendes zu erwägen:

Wie in der vorangehenden Arbeit kurz erwähnt ist, erfährt die Magenschleimhaut, wenn sie unter Toluol bei schwach alkalischer Reaktion sich selbst überlassen bleibt, eine Art Selbstverdauung. Ein Teil der Eiweifsstoffe verflüssigt sich, und in der Lösung tritt Tryptophanreaktion auf. Es liegt hier ein dem Trypsin, mehr noch dem proteolytischen Ferment der Leber ähnliches Agens vor, und es kann recht wohl die Frage aufgeworfen werden, ob die am Pylorus nachweisbaren Verdauungswirkungen nicht von diesem sonst unbekannten Eiweifsferment abhängen. Der Kürze wegen will ich, um Wiederholungen zu vermeiden, dieses Ferment „Pseudopepsin" nennen.

Nach dem Gesagten wäre es charakterisiert 1. dadurch, dafs es auch in schwach alkalischer Lösung, wo alles Pepsin zerstört wird,

[1]) Archiv für Anatomie und Physiologie 1879, S. 95.

[2]) Sitzungsberichte der k. Akademie der Wissenschaften, Wien III, 1875.

[3]) Pflügers Archiv **18**, 169.

seine Wirkung entfaltet; 2. dafs es als Produkt Tryptophan bildet[1]); dazu käme aber 3. dafs es seine spaltende Wirkung nicht wie Trypsin oder gar das proteolytische Ferment der Leber durch Säuren einbüfst, sondern ebenso gut bei Anwesenheit von freier Salzsäure bis zu 0,3 Proz. und zwar auch bei Anwesenheit von echtem Pepsin entfaltet.

Diese Unterscheidung zweier peptisch wirkender Magenfermente greift in eine seit langen Jahren geführte, aber bisher nicht endgültig entschiedene Kontroverse ein, welche sich seinerzeit zwischen Kühne und Hoppe-Seyler entwickelt hat. Hoppe-Seyler nahm an, dafs bei der Pepsinverdauung neben Albumosen und Peptonen auch weitere Spaltungsprodukte: Leucin, Tyrosin, auftreten, eine Ansicht, die in den Arbeiten seiner Schüler, und jüngst noch durch Lawrow[2]), vertreten worden ist. Demgegenüber konnte Kühne mit gereinigtem Pepsin die Bildung dieser Produkte und auch das Auftreten der Tryptophanreaktion nie erhalten und hielt diesen Widerspruch für dadurch veranlafst, dafs Hoppe-Seyler mit kräftigen, aber nicht weiter gereinigten Schleimhautauszügen gearbeitet habe, während Hoppe-Seyler selbst und zuletzt Winternitz[3]) umgekehrt die Meinung verfochten, dafs die Reindarstellung des Pepsins einen so schwächenden Einfluſs auf seine Wirksamkeit ausübe, dafs es dann die Spaltung der Albumosen zu den Endprodukten erst nach unverhältnismäfsig längerer Einwirkung bewirke.

Diese Anschauung hält auch Malfatti[4]) bei der jüngst erfolgten Wiedergabe einiger hierher gehöriger Versuche für die wahrscheinlichere. Er beobachtete, dafs bei Verdauung von sogenanntem Witte-Pepton mit Glycerinextrakten oder mit dialysierten Infusen von Magenschleimhaut in neutraler oder in saurer (0,04 bis 0,22proz. HCl), oder mit Soda schwach alkalisch gemachter (0,09 bis 0,28proz.) Lösung früher oder später Tryptophanreaktion auftrat. Um etwa beigemengtes Trypsin zu zerstören, digerierte er die Präparate längere Zeit in kräftig saurer Lösung. Bei den mit der Lösung neuerlich ausgeführten Verdauungsversuchen fehlte nun die Tryptophanreaktion in den alkalischen und den ganz schwach sauren Proben, war aber in den Proben mit dem Säure-

[1]) Der geringen Fermentmenge entsprechend, tritt die Tryptophanreaktion meist erst nach mehrtägiger Verdauung auf.

[2]) Zeitschrift für physiol. Chemie 26, 513.

[3]) Zeitschrift für physiol. Chemie 16, 464.

[4]) Zeitschrift für physiol. Chemie 31, 43.

gehalt von 0,2 Proz. vorhanden. Danach nimmt Malfatti an, dafs die Tryptophanbildung durch das Pepsin selbst erfolgt, ohne jedoch zu verkennen, dafs kräftig peptisch wirkende Pepsinpräparate, z. B. Grüblers Pepsinum purissimum oder nach Pekelharing[1]) dargestelltes und mit Bleiessig-Ammoniak gereinigtes Ferment die Tryptophanbildung ganz vermissen lassen können.

Es scheint mir, dafs die von Malfatti angeführten Thatsachen eine andere Deutung als die Annahme mindestens zweier peptischer Fermente nicht zulassen. Denn die Individualität eines Ferments ist, da seine Charakterisierung als chemische Substanz nicht möglich ist, nur durch seine Wirkungsweise verbürgt. Im vorliegenden Falle hängt sonach die Entscheidung davon ab, ob konzentrierte Pepsinlösungen, wie Hoppe-Seyler meint, in der That Leucin, Tyrosin und Tryptophan u. s. w. bilden oder nicht. Die neueren vorliegenden Thatsachen gestatten in dieser Richtung keinen Zweifel. Den älteren Beobachtungen von Kühne und seinen Schülern schliefst sich da der Befund Pfaundlers[2]) an, der selbst bei intensivster monatelanger Verdauung mit Grüblers Pepsin das Auftreten von Leucin und Tyrosin vermifste. Von meinen eigenen Erfahrungen scheint mir die folgende mafsgebend: Die alkalischen Rohauszüge der Magenschleimhaut, wie man sie daraus durch Autolyse erhält, erweisen sich nach Aktivieren mit Säure als tryptophanbildend, nicht aber, unter sonst gleichen Bedingungen, die daraus mit Hülfe des Uranylacetatverfahrens dargestellten reinen Zymogenlösungen und zwar weder bei kurzer, noch bei intensivster und lang dauernder Wirkung. Da es nun ein Widersinn ist, anzunehmen, dafs unter sonst gleichen Bedingungen das Pepsin einmal Tryptophan bildet, das andere Mal nicht, so kann es sich dort, wo Tryptophan auftritt, nur um ein zweites peptisches Ferment handeln, wenn es auch noch nicht gelungen ist, dieses relativ veränderliche „Pseudopepsin“ frei von Pepsin darzustellen[3]).

Die Anwesenheit zweier peptischer Fermente in der Magenschleimhaut ist geeignet, den obigen Beweisgründen für die

---

[1]) Zeitschrift für physiol. Chemie 22, 233.

[2]) Zeitschrift für physiol. Chemie 30, 90.

[3]) Ob daneben noch Trypsin im Magen so regelmäfsig vorkommt, als man, wenn Malfattis Vermutung richtig wäre, nach der Regelmäfsigkeit der Tryptophanbildung bei der Autolyse der Magenmucosa annehmen müfste, will ich dahingestellt sein lassen, kann aber diese Annahme nicht für wahrscheinlich halten.

Pepsinbildung im Pylorus eine andere Deutung zu geben. Man könnte nun daran denken, dafs das „Pseudopepsin“ das alleinige peptische Ferment des Pylorus darstellt. Um über diese und ähnliche Verhältnisse Aufschlufs zu erhalten, habe ich mehrere Versuchsreihen durchgeführt. Zunächst, um die Frage nach einer etwaigen Imbibition der Pylorusmucosa mit Profermenten zu erledigen, untersuchte ich frisch secernierten Magensaft auf die Anwesenheit von Profermenten. Es wurde einem Hund eine Pawlowsche Magen-Ösophagusfistel angelegt, so dafs das Tier der Scheinfütterung unterworfen werden konnte. Der dabei gewonnene Magensaft war klar, nur wenig schleimig. Derselbe wurde mit Soda schwach alkalisch gemacht und 24 Stunden bei 40° digeriert. Die jetzt fermentfreie Flüssigkeit wurde auf Profermente untersucht. Trotz der täglichen Untersuchung durch sechs Wochen hindurch konnte das Vorhandensein von Prochymosin oder Propepsin nicht nachgewiesen werden. Im sauren Magensaft normaler Tiere scheinen somit keine Profermente vorzukommen, was sehr verständlich ist, wenn man sich erinnert, dafs sie durch die vorhandene Säure fast augenblicklich in Fermente übergeführt werden[1]).

Obgleich dieser Versuch nur am Hunde ausgeführt wurde, dürfte sein Ergebnis auch für andere Säugetiere Gültigkeit haben. Jedenfalls hat die Annahme, dafs das an der Pylorusschleimhaut vorgefundene Propepsin ihm durch den Magensaft zugeführt worden ist, keinen Halt.

Ich habe nun weiter untersucht, ob alle Teile der Magenschleimhaut Propepsin enthalten oder nicht. Die Schwierigkeiten, welche sich daraus ergaben, dafs die Zone der Fundusdrüsen und der Pylorusdrüsen sich nicht scharf gegeneinander absetzen, wurde dadurch umgangen, dafs die intermediäre Zone, welche beiderlei Elemente enthält, für sich zur Untersuchung kam.

Ich teilte den Magen des Schweines nach Greenwood[2]) in vier Teile: a) Cardiagegend, b) Fundus, c) intermediäre Zone, d) Pylorus. Die Schleimhaut der verschiedenen Bezirke wurde in annähernd gleicher Ausdehnung abgetragen, zerhackt, gewogen und gleiche Gewichtsmengen verschiedener Schleimhautbezirke mit

[1]) Ob die zahlreichen Litteraturangaben über das Auffinden von Prochymosin oder Propepsin im Magensaft von Menschen richtig sind oder auf der Verwendung einer fehlerhaften Nachweismethode beruhen, will ich zunächst nicht entscheiden.

[2]) Journal of Physiology 5, 195, (1885).

der doppelten Gewichtsmenge mit Soda schwach alkalisch gemachten Wassers versetzt und drei Wochen bei 40° C. der Digestion unterworfen. Nach dieser Zeit wurde in gleichen Volummengen der vier Lösungen der Gehalt an Propepsin beziehungsweise des daraus erhältlichen Pepsins nach Mett bestimmt. Die relative Pepsinmenge ist auf Grund der Regel von E. Schütz[1]) durch Quadrierung der Länge der verdauten Eiweifssäule berechnet.

Versuch I. Schwein.

Magenteil	Menge des Auszugs	1/5 Norm.-HCl	Zeit der Verdauung	Länge des verdauten Eiweifscylinders	Relative Pepsinmenge
Fundus . . .	2 ccm	2 ccm	12 Stunden	4,5 mm	20,5
Interm. Zone	2 „	2 „	12 „	3 „	9
Pylorus . . .	2 „	2 „	12 „	1 „	1
Cardia	2 „	2 „	12 „	0 „	0

Versuch II. Schwein.

Magenteil	Menge des Auszugs	1/5 Norm.-HCl	Zeit der Verdauung	Länge des verdauten Eiweifscylinders	Relative Pepsinmenge	Auf Pylorus = 1 berechnet
Fundus	2 ccm	2 ccm	12 Stund.	5 mm	25	20,5
Interm. Z.	2 „	2 „	12 „	3 „	9	7,2
Pylorus	2 „	2 „	12 „	1,1 „	1,22	1
Cardia	2 „	2 „	12 „	0 „	0	0

Versuch III. Kaninchen.

Magenteil	Menge des Auszugs	1/5 Norm.-HCl	Zeit der Verdauung	Länge des verdauten Eiweifscylinders	Relative Pepsinmenge
Fundus . . .	2 ccm	2 ccm	12 Stunden	4,2 mm	17,64
Pylorus . . .	2 „	2 „	12 „	1 „	1

Versuch IV. Hund.

Fundus . . .	2 ccm	2 ccm	12 Stunden	2,8 mm	21,8
Pylorus . . .	2 „	2 „	12 „	0,6 „	1

Versuch V. Kalb.

Fundus . . .	2 ccm	2 ccm	12 Stunden	1,8 mm	20,1
Pylorus . . .	2 „	2 „	12 „	0,4 „	1

[1]) Zeitschrift f. physiol. Chemie 5, 577.

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, dafs das Verhältnis der Pepsinmenge in den Magenabschnitten verschiedener Tiere überraschend konstant ist, und zwar ist der Pepsingehalt der Fundusschleimhaut, die Identität beider peptischen Fermente zunächst vorausgesetzt, etwa zwanzigmal gröfser als jener der Pylorusmucosa. Meine Befunde, welche sicher frei sind von den durch Pepsinimbibition bedingten Fehlern, bestätigen durchaus die bisher in dieser Richtung mit Hülfe von Grützners Methode gewonnene Vorstellung über die Menge, in welcher das Pepsin in den einzelnen Magenabschnitten gebildet wird. Ich stelle die in dieser Richtung gefundenen Zahlen zum Vergleich nebeneinander:

Autor . .	Grützner[1])	Langley[2])	Greenwood[3])	Ebstein[4])	Klug[5])	
Tierart	Hund	Maulwurf	Schwein	Hund	Rind	Schwein
Cardia	—	—	1	—	—	—
Fundus	15—25	73	80	2—3	1	1
Pylorus	1	1	2	1	0,69	0,67

Mit diesem Vergleich der peptischen Wirkung ist natürlich noch nicht entschieden, ob das peptische Ferment des Pylorus Pepsin ist oder Pseudopepsin.

Zur Entscheidung dieser Frage habe ich in einer gröfseren Anzahl von Einzelversuchen mit Stücken von Fundus- und Pylorusschleimhaut das Auftreten der Tryptophanreaktion bei langdauernder Verdauung verfolgt. Dabei ergab sich kein Unterschied. Zwar trat bei den Versuchen mit Fundusmucosa die Reaktion zum Teil später auf als beim Pylorus, dann aber eher intensiver. Das Pseudopepsin gehört somit beiden Magenabschnitten an und scheint in beiden in etwa gleich geringer Menge vorhanden zu sein.

Da das Pseudopepsin auch in schwach alkalischer Lösung wirkt, wurden ferner mit Fundus- und Pylorusstücken vom Schwein Verdauungsversuche bei schwach alkalischer Reaktion angestellt. Es ergab sich, dafs bei langandauernder Verdauung auch bei

[1]) „Neuere Untersuchungen über Bildung und Ausscheidung des Pepsins." Breslau 1875.

[2]) Journal of Physiology 3, 269.

[3]) Daselbst 4, 195.

[4]) Archiv für mikroskop. Anatomie 4, 515 (1870).

[5]) Ungar. Archiv für Medizin 3, 87.

schwach alkalischer Reaktion, namentlich von Pylorusauszügen Eiweifs verdaut wird.

Diese Versuche zeigen, dafs die Pylorusschleimhaut trotz ihrer geringeren Verdauungskraft kaum weniger Pseudopepsin enthält als die Fundusschleimhaut. Trotzdem könnte sie daneben auch echtes Pepsin bilden. Um diese Frage zu entscheiden, benutzte ich die Erfahrung, dafs man mit Hülfe der Uranylfällung das Propepsin ohne merkliche Verluste und frei von dem tryptophanbildenden Ferment erhält. In wiederholten Versuchen mit dem Rohextrakt der Pylorusschleimhaut wurde dabei ein negatives Resultat erzielt. Es gelang auf diesem Wege weder Propepsin noch überhaupt ein verdauendes Ferment aufzufinden, und so führen diese Versuche zu der Folgerung, dafs die peptische Wirkung der Pylorusmucosa nur durch die Anwesenheit von „Pseudopepsin" zu erklären ist, und dafs dieses aller Wahrscheinlichkeit nach das einzige peptische Ferment des Pylorus darstellt.

2. Der Anteil des Pylorus an der Labbildung.

Schon in seiner ersten Arbeit über das Labferment bemerkt Hammarsten[1]), dafs die pars pylorica, durch Infusion mit verdünnter Säure geprüft, sich „ungemein ärmer" an Lab erweist als der Fundus. Grützner[2]) und Langley[3]) fanden, dafs der Labgehalt in den verschiedenen Magenabschnitten, auch im Ösophagus des Frosches, dem Pepsingehalt etwa parallel geht. Dabei machte Grützner die Bemerkung, dafs der Pylorus das Labferment in anderer Form enthält, vielleicht in einer Vorstufe, da Glycerin aus ihm sehr wenig zu extrahieren vermochte, während die Salzsäure dies that, wogegen Langley im Fundus nur Prochymosin fand. Greenwood[4]) fand beim Schwein den Labgehalt des Fundus sechsmal gröfser als jenen des Pylorus. Hingegen soll nach L. Sommer[5]) im Kälbermagen der Pylorus der labreichste Teil sein.

Meine Versuche zeigten unerwarteterweise, dafs das Prochymosin nur in dem Verbreitungsgebiet der Fundusdrüsen, also der „Labzellen" älterer Autoren vorkommt.

[1]) Malys Jahresbericht für Tierchemie 2, 118 (1872).

[2]) Daselbst.

[3]) Daselbst.

[4]) Daselbst.

[5]) „Beitrag zur Kenntnis des Labferments und seiner Wirkung." Inaugur.-Diss. Würzburg 1897.

Die Ausführung der Versuche gestaltete sich ebenso wie die Prüfung auf Proferment. Die einzelnen Magenabschnitte wurden erst behufs Zerstörung des schon vorhandenen Labs in schwach alkalischer Lösung tage- oder wochenlang digeriert, dann nach Aktivieren mit Säure und Zurückneutralisieren mit vorgewärmter Milch zusammengebracht. Zur annähernden quantitativen Schätzung wurde bestimmt, welches Quantum Milch von 1 ccm der erhaltenen Lösung zum Gerinnen gebracht wird.

Die Versuche am Schweinsmagen ergaben überraschenderweise, dafs nur der Fundus Prochymosin enthält, aber weder Cardia noch Pylorus. Zum Beispiel:

Fundus: 1 ccm bringt 1000 ccm Milch zum Gerinnen,
Pylorus: 1 „ — ohne Wirkung,
Cardia: 1 „ — „ „

Da dieses Resultat mit den bisherigen Angaben über den Parallelismus zwischen Lab- und Pepsinbildung nicht im Einklang steht, wurde der Versuch beim Hunde, Kalbe und Kaninchen wiederholt. Überall ergab sich ausnahmslos dasselbe Resultat, dafs nämlich nur der Fundus Prochymosin bildet.

Wenn somit nur der Fundus die Bildungsstätte des Labs darstellt, so erscheint — vorausgesetzt die Hauptzellen des Fundus seien mit den Pylorusdrüsenzellen identisch — die Annahme, dafs von den Hauptzellen neben Pepsin auch Lab gebildet wird, unhaltbar. Es ist vielmehr auch daran zu denken, dafs die Belegzellen das Lab produzieren, und somit nicht unmöglich, dafs der Name „Labzellen“ der älteren Autoren in seiner eigentlichen Bedeutung wieder zu Ehren kommt.

III.

Zur Kenntnis der Entstehung der Kynurensäure im Organismus.

Von Dr. Karl Glaessner aus Prag und Dr. Leo Langstein aus Wien.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

Die Konstitution der von Liebig[1]) entdeckten Kynurensäure als einer γ-Oxychinolinkarbonsäure ist durch die Arbeiten von Schmiedeberg[2]) und Schultzen, dann von Kretschy[3]), endlich durch die synthetische Darstellung des Kynurins durch Wenzel[4]) aufgeklärt. Unentschieden ist jedoch trotz zahlreicher darauf gerichteter Untersuchungen geblieben, woraus und wo der Hundeorganismus diese Säure bildet. Die in dieser Richtung vorliegenden Versuche beziehen sich auf das Studium der Abhängigkeit der Kynurensäurebildung einerseits von der Nahrungszufuhr, andererseits von der Einführung von Substanzen, von denen man eine Bildung von Kynurensäure durch den intermediären Stoffwechsel erhoffte. Dabei hat sich in allen neueren Untersuchungen, besonders deutlich in den von Schmidt[5]) methodisch ausgeführten Versuchen, ergeben, dafs Fleischkost die Kynurensäureausscheidung vermehrt, dafs somit aller Wahrscheinlichkeit nach die Vorstufe der Kynurensäure unter den Abbauprodukten des Eiweifses zu suchen ist.

---

[1]) Liebig, Annalen d. Chem. und Pharm. 86, 125 (1853).

[2]) Schmiedeberg und Schultzen, ebenda 164, 155 (1872).

[3]) Kretschy, Berichte d. d. chem. Ges. 12, 1673 (1879).

[4]) Wenzel, Monatshefte f. Chemie 15, 453 (1894).

[5]) Schmidt, Über das Verhalten einiger Chinolinderivate im Tierkörper mit Rücksicht auf Bildung der Kynurensäure. Diss. (unter Jaffé), Königsberg 1889.

Bemerkenswert ist die Beobachtung Schmiedebergs[1]) an einem mit Vegetabilien gefütterten Hunde, dafs die Kynurensäure erst nach zehntägiger Fleischfütterung im Harn auftrat. Andererseits machte er die Beobachtung, dafs es Hunde giebt, die trotz Fleischfütterung Kynurensäure nicht ausscheiden. Dafs nicht die Verfütterung der Extraktivstoffe des Fleisches die Kynurensäureausscheidung bedingt, lehrt ein Versuch Rubners[2]), der die Säure auch im Harn mit ausgelaugtem Fleisch ernährter Hunde fand. Dafs jedoch nicht ausschliefslich das Eiweifs der Nahrung zur Kynurensäurebildung führt, geht daraus hervor, dafs auch bei Ausschlufs derselben Kynurensäure im Harn auftreten kann. So fanden sie Voit[3]) und Riederer wie auch Naunyn[4]) und Riess beim hungernden Hunde, allerdings nur in geringster Menge, und letztere Autoren führen das Vorkommen auf Zerfall von Körpereiweifs zurück.

Um der Erforschung der Muttersubstanz näher zu kommen, verfütterte man erstens der Kynurensäure durch die Konstitution nahestehende Substanzen, die man auch im Eiweifsmolekül präformiert glaubte, zweitens Spaltungsprodukte von Eiweifs, die der Verdauung oder Fäulnis desselben ihre Entstehung verdankten. Zur ersten Gruppe gehören die Versuche von Schmidt[5]), welche die Verfütterung von Chinolinderivaten zum Gegenstand hatten, ohne jedoch vermehrte Kynurensäureausscheidung zu erzielen; zur zweiten Gruppe die Versuche Rosenhains[6]) mit Skatol, Skatolkarbonsäure, Niggelers[7]) und Solomins[8]) mit Isatin, endlich Hausers[9]) mit Tyrosin. Letzterer stellte sich die Möglichkeit der Entstehung der Kynurensäure aus dem Tyrosin durch einen synthetischen Vorgang mit Hülfe der von His[10]) für das Pyridin gefundenen Methylierung vor. Alle genannten Versuche führten zu einem negativen Resultat.

Hand in Hand mit diesen Untersuchungen gingen solche,

[1]) Schmiedeberg, l. c.

[2]) Rubner, Zeitschr. f. Biolog. 21, 279 (1885).

[3]) Voit und Riederer, Zeitschr. f. Biolog. 1, 315 (1865).

[4]) Naunyn und Riess, Reichert und Du Bois' Archiv 1869, S. 390.

[5]) Schmidt, l. c.

[6]) Rosenhain, Beiträge zur Kenntnis der Kynurensäurebildung im Tierkörper. Diss. (unter Jaffé), Königsberg 1886.

[7]) Niggeler, Archiv f. exp. Pathol. 3, 70 (1875).

[8]) Solomin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 497.

[9]) Hauser, Archiv f. exp. Pathol. 36, 1.

[10]) His, Archiv f. exp. Path. 22, 253 (1887).

welche vor allem den Ort feststellen sollten, wo die Kynurensäure oder deren Vorstufe entsteht.

Naturgemäfs richtete sich dabei die Aufmerksamkeit vor allem auf die Vorgänge im Darm und zwar zunächst auf die daselbst gegebene bakterielle Zersetzung.

Baumann[1]) fand, dafs trotz Herabsetzung der Darmfäulnis auf ein Minimum durch Darreichung von Calomel mit der Nahrung die Kynurensäureausscheidung keine Änderung erfuhr, während die Ätherschwefelsäuren vollständig aus dem Harn geschwunden waren. Auch Morax[2]), der durch Zufuhr von Jodoform die Ausscheidung der gepaarten Schwefelsäuren stark herabsetzte, konnte einen Einfluſs dieses Mittels auf die Quantität der ausgeschiedenen Kynurensäure nicht nachweisen.

1. Bildung der Kynurensäure nach Zufuhr bestimmter Fraktionen der Pankreasverdauungsprodukte.

Durch diese negativen Ergebnisse ist aber durchaus nicht ausgeschlossen, dafs die Vorstufe der Kynurensäure im Darm gebildet wird und erst im intermediären Stoffwechsel die Umwandlung zu Kynurensäure erfährt. Insbesondere wird durch sie die Vermutung, dafs ein bestimmter, wohl der aromatischen Reihe angehöriger Molekular-Komplex des Eiweifses die Muttersubstanz der Kynurensäure vorstellt, nicht berührt.

Nachdem nun die in Schmiedebergs Laboratorium auf Grund eines ähnlichen Gedankenganges ausgeführten Untersuchungen sichergestellt hatten, dafs die Verfütterung des Tyrosins, und somit wohl der Tyrosingruppe des Eiweifses, die Kynurensäureausscheidung nicht beeinflufst, schlug uns Herr Professor Hofmeister vor, zu untersuchen, ob andere durch Pankreasverdauung entstehende aromatische Spaltungsprodukte des Eiweifses die die Kynurensäure bildende Substanz enthalten.

Zu diesem Zwecke wurden mit Hülfe geeigneter Lösungsmittel die Produkte der vorgeschrittenen Pankreasverdauung fraktioniert, jede Fraktion gesondert verfüttert, und die danach ausgeschiedene Kynurensäure quantitativ bestimmt.

Es wurden je 20 Rinderpankreas vom Fett befreit, fein gehackt, mit der zehnfachen Gewichtsmenge Wasser unter Zusatz von Toluol durch acht bis zehn Tage bei Bruttemperatur der Selbstverdauung überlassen. Nach dieser Zeit wurde von dem zum gröfsten Teil aus

[1]) Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 10, 131 (1886).
[2]) Morax, Zeitschr. f. physiol. Chem. 10, 318.

Bindegewebe und Fett bestehenden Rückstand abkoliert, das Filtrat enteiweifst und zum dicken Syrup eingedampft.

Die Fütterungsversuche wurden an einem ca. 12 kg schweren Hunde ausgeführt, dessen täglich ausgeschiedene Kynurensäuremenge sowohl bei Milch-Brotkost als bei Fleischzufuhr in längerer Versuchsreihe vorher bestimmt worden war.

Zum quantitativen Nachweis der Kynurensäure im Harn bedienten wir uns der Methode von Capaldi[1]), zur Identifizierung der Überführung in das charakteristische Baryumsalz. Es wurden mit wenigen Ausnahmen Doppelbestimmungen ausgeführt, und dazu stets die durch Katheterisierung entnommene 24 stündige Harnmenge verwendet.

Über das Verhalten der Kynurensäureausscheidung bei unserem Versuchshund unter normalen Verhältnissen geben nachstehende Tabellen Aufschluss.

Tabelle I.

A. Fütterung mit Brot und Milch.

Kost	Tagesmenge des Harns	Kynurensäure
500 g Brot, 1 l Milch	1060 ccm	0,04625 g
500 „ „ 1 „ „	1100 „	0,03142 „
500 „ „ 1 „ „	1115 „	0,03244 „
500 „ „ 1 „ „	950 „	0,0354 „
500 „ „ 1 „ „	1220 „	0,022 „
500 „ „ 1 „ „	800 „	0,0338 „
500 „ „ 1 „ „	980 „	0,0297 „
500 „ „ 1 „ „	1040 „	0,0301 „
500 „ „ 1 „ „	900 „	0,0197 „
500 „ „ 1 „ „	850 „	0,0213 „
500 „ „ 1 „ „	1050 „	0,0224 „
500 „ „ 1 „ „	1115 „	0,023 „

Tabelle II.

B. Fütterung mit Fleisch.

Kost	Tagesmenge des Harns	Kynurensäure
500 g Pferdefleisch	750 ccm	0,0963 g
500 „ „	800 „	0,08766 „
500 „ „	680 „	0,0942 „
1000 „ „	720 „	0,1246 „
1000 „ „	780 „	0,1322 „

[1]) Capaldi, Zeitschrift f. physiol. Chemie 23, 92.

C. Verfütterung der in Alkohol unlöslichen Bestandteile der Pankreasverdauungsprodukte.

Der in der oben angegebenen Weise erhaltene, alle wasserlöslichen durch die Pankreasverdauung entstandenen Stoffe enthaltende Syrup wurde in der Hitze mit 95proz. Alkohol extrahiert, wobei ein Teil in Lösung ging. Der hauptsächlich aus Tyrosin und Leucin bestehende Rückstand wurde durch wiederholtes Lösen und Fällen von den leicht in Alkohol löslichen Stoffen befreit, getrocknet, und gewogene Mengen in wässeriger Lösung mittelst Schlundsonde dem Tiere beigebracht. Der hinterher erhaltene Harn ist dunkel gefärbt; niemals trat Durchfall oder Erbrechen ein.

Tabelle III.

Kost	Gereicht	Tagesmenge des Harns	Kynurensäure	Bemerkungen
1000 g Milch 500 „ Brot	—	1050 ccm	0,0367 g	
	—	1120 „	0,0298 „	
	100 g Rückstand	1000 „	0,03142 „	Kein Erbrechen oder Durchfall.
	—	1150 „	0,03012 „	
	80 g Rückstand	1280 „	0,0392 „	Kein Erbrechen oder Durchfall.
	—	980 „	0,0351 „	

Die Verfütterung dieser Fraktion A ist somit ohne Einfluſs auf die Kynurensäureausscheidung.

D. Verfütterung der gesamten alkohollöslichen Produkte.

Wir gingen nun daran, die alkohollösliche Fraktion (B) zu verfüttern. Sie wurde zu diesem Zwecke, nachdem der Alkohol abdestilliert worden war, zum dicken Syrup eingedampft, der, in kleinen abgewogenen Mengen in viel Wasser gelöst, dem Hunde mittelst Schlundsonde eingeführt wurde. Der Syrup hatte einen harnähnlichen Geruch und sehr bitteren Geschmack.

Tabelle IV.

Kost	Gereicht	Tagesmenge des Harns	Kynurensäure	Bemerkungen
1000 g Milch 500 „ Brot	—	1000 ccm	0,0271 g	
	—	1120 „	0,025 „	
	50 g Frakt. B.	400 „	0,2166 „	Der Hund nimmt an diesem Tag keine Nahrung mehr. Wiederholtes Erbrechen und Durchfall.
	—	1150 „	0,0435 „	
	—	980 „	0,0276 „	

In dieser Fraktion war sonach die Vorstufe der Kynurensäure enthalten. Auffallend waren die stark toxischen Eigenschaften des verfütterten Gemenges; der Hund erbrach zum erstenmal nach dreiviertel Stunden, dann noch viermal in Intervallen von ungefähr halbstündiger Dauer und machte einen schwerkranken Eindruck. Der Urin war rot und enthielt Eiweifs in mäfsigen Mengen. Trotzdem also ein grofser Teil der verfütterten Substanz durch Erbrechen und Diarrhöe der Resorption entzogen war, fand eine Vermehrung der Kynurensäure aufs **achtfache** statt. Wir wiederholten den Versuch, indem wir durch Vorhalten von Fleisch und Knochenstücken nach der Fütterung die Sekretion des Magensaftes und bessere Peristaltik anzuregen suchten. Auch diesmal erbrach der Hund, wenn auch erst nach zwei Stunden, und die toxischen Erscheinungen stellten sich wiederum ein.

Tabelle V.

Kost	Gereicht	Tagesmenge des Harns	Kynurensäure	Bemerkungen
1000 g Milch 500 „ Brot	**50 g Frakt. B.**	850 ccm 370 „ 880 „ 1100 „	0,02154 g 0,2216 „ 0,0422 „ 0,0226 „	Nach 2 Stunden Erbrechen, das noch 3 mal erfolgte; Diarrhöe; Eiweifs im Harn.

Nachdem durch diese beiden letzten Versuche sichergestellt war, dafs im alkoholischen Auszug die Muttersubstanz der Kynurensäure zu suchen ist, wurde dessen weitere Fraktionierung versucht. Gleichzeitig im hiesigen Institut von Dr. Emerson ausgeführte Versuche, über welche anderenorts berichtet werden wird, hatten gezeigt, dafs die noch unbekannten aromatischen Produkte der Pankreasverdauung sich durch Aceton zum Teil trennen lassen. Mit Einwilligung von Professor Hofmeister und Dr. Emerson haben wir von dieser Erfahrung Nutzen gezogen.

Es wurde zu diesem Zwecke der alkoholische Auszug in wenig Wasser gelöst, mit der zehnfachen Menge Aceton versetzt und nach wiederholtem kräftigen Umschütteln 24 Stunden stehen lassen. Dabei bildeten sich drei Schichten:

1. die oberste Schichte: das gelbgefärbte Acetonextrakt (B_1);
2. eine intermediäre Zone, einen gelbbraunen körnigen Niederschlag darstellend (B_2);

3. eine dunkelbraune syrupöse Masse, den Boden des Gefäfses einnehmend (B_3).

Diese drei Fraktionen wurden gesondert verfüttert.

E. Verfütterung der in Aceton löslichen Stoffe des Alkoholextraktes.

Das Aceton wurde abdestilliert, der Rückstand eingedampft und gewogene Mengen in Wasser gelöst, dem Hunde mittelst Schlundsonde beigebracht.

Tabelle VI.

Kost	Daneben gereicht	Tagesmenge des Harns	Kynurensäure	Bemerkungen
1000 g Milch 500 „ Brot	—	1000 ccm	0,0435 g	
	15 g B_1	670 „	0,0423 „	Erbrechen nach 2 Stunden, Kollaps, Diarrhöe, Albuminurie.
	—	900 „	0,0377 „	
	25 g B_1	900 „	0,036 „	Kein Erbrechen, Kollaps, Diarrhöe.
	—	1060 „	0,0412 „	

F. Verfütterung der in Aceton unlöslichen Stoffe des Alkoholextraktes.

Das Gemenge $B_2 + B_3$ wurde bei 100° getrocknet, in Wasser gelöst, mittelst Schlundsonde verfüttert.

Tabelle VII.

Kost	Daneben gereicht	Tagesmenge des Harns	Kynurensäure	Bemerkungen
1000 g Milch 500 „ Brot	—	1120 ccm	0,0337 g	Kein Erbrechen; Diarrhöe.
	30 g $B_2 + B_3$	900 „	0,2500 „	
	—	1060 „	0,04702 „	
	—	1150 „	0,0311 „	

Es wurde nun B_2 und B_3 mittelst Filtration durch Seide an der Saugpumpe getrennt und beide Anteile gesondert verfüttert.

Tabelle VIII.

Verfütterung von B_2.

Kost	Daneben gereicht	Tagesmenge des Harns	Kynurensäure	Bemerkungen
1000 g Milch 500 „ Brot	—	1000 ccm	0,02154 g	Hund bleibt normal.
	30 g B_2	1300 „	0,0431 „	
	—	1270 „	0,0225 „	

Tabelle IX.
Verfütterung von B_3.

Kost	Daneben gereicht	Tagesmenge des Harns	Kynurensäure	Bemerkungen
1000 g Milch, 500 „ Brot	—	1010 ccm	0,0225 g	Wiederholtes Erbrechen. Diarrhöe, Kollaps, Eiweifs i. Harn; Hund nahm keine Nahrung.
	15 g B_3	570 „	0,19925 „	
	—	1080 „	0,0254 „	

Tabelle X.

Verfüttert wurde durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen mit Aceton gereinigter Syrup (B_3).

Kost	Daneben gereicht	Tagesmenge des Harns	Kynurensäure	Bemerkungen
1000 g Milch, 500 „ Brot	—	1020 ccm	0,0214 g	Kein Erbrechen: nur Diarrhöe, sonst normal.
	15 g B_3	840 „	0,243 „	
	—	1040 „	0,0467 „	

Aus diesen Versuchen geht mit Sicherheit hervor, dafs die Kynurensäure einer Substanz ihre Entstehung verdankt, die ein Spaltungsprodukt des Eiweifses durch Pankreasverdauung ist.

Beim Vergleich der Versuchszahlen sieht man, dafs es gelungen ist, dieselbe in zunehmend konzentrierter Lösung zu erhalten. Zum Schlufs brachten 15 g der in Alkohol löslichen, in Aceton unlöslichen, syrupös sich ausscheidenden Fraktion (B_3) einen doppelt so grofsen Ausschlag hervor als bei demselben Hunde die Verfütterung von 1 kg Fleisch.

Da nun Fraktion B_3 sicher noch ein Gemenge ist, von welchem die Muttersubstanz der Kynurensäure einen Teil ausmacht, so ist Aussicht vorhanden, durch weitere Fraktionierung unter steter Berücksichtigung des Tierversuches zur Isolierung derselben zu gelangen. Wir haben indessen diesen umständlichen Weg nicht weiter verfolgt, weil die inzwischen fortgeschrittenen Untersuchungen des Herrn Dr. Emerson die Aussicht eröffneten, auf kürzerem Wege ans Ziel zu gelangen.

2. Abhängigkeit der Entstehung der Kynurensäure von der Pankreasverdauung.

Der obige Befund, dafs die Vorstufe der Kynurensäure durch Pankreasverdauung entsteht, schliefst noch nicht die davon unabhängige Bildung derselben im intermediären Stoffwechsel aus. Um eine Entscheidung über diesen Punkt zu erhalten, wurden Versuche an Hunden angestellt, denen das Pankreas teilweise exstirpiert und aufser Verbindung mit dem Darm gebracht, oder bei denen der Ductus pancreaticus unterbunden worden war.

Professor Dr. Dietrich Gerhardt, der diese Operation an einer Reihe von Hunden zu einem anderen Zwecke ausführte stellte uns den Harn dieser Tiere vor und nach der Operation zur Verfügung, wofür wir ihm auch an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

Versuch I. 10 kg schwerer Hund.

Zeit	Kost	Harnmenge	Kynurensäure	Bemerkungen
2. März. Zwei Tage vor der Operation	Milch	1000 ccm	0,038 g	

4. März 1901. Unterbindung des Ductus pancreaticus.

10. März 1901. Laparotomie, bei der das Pankreas knorpelhart das Sekret gestaut gefunden wird, so dafs ein Einfliefsen desselben in den Darm ausgeschlossen ist.

14. März. Untersuchung des Harns.

Kost	Harnmenge	Kynurensäure	Bemerkungen
Fleisch	880 ccm	Spuren, nicht wägbar	Gute Resorption.

Versuch II. 14 kg schwerer Hund.
Vor der Operation.

Zeit	Kost	Harnmenge	Kynurensäure	Bemerkungen
8. März	Milch	1000 ccm	0,0342 g	

10. März 1901. Resektion des Pankreas.
8 Tage nach der Operation.

Kost	Harnmenge	Kynurensäure	Bemerkungen
Fleisch, Fett	380 ccm	Unwägbar	Schlechte Resorption

Versuch III. Pankreasresektion am 12. Januar 1901.
Untersuchung des Harnes am 20. Januar 1901.

Kost	Harnmenge	Kynurensäure	Bemerkungen
Milch, Fleisch-	300 ccm	0,0062 g	Schlechte Fettresorption;
Fettfütterung	320 „	0,0066 „	im Harn kein Zucker.

Wie man sieht, bildeten alle drei Versuchstiere Kynurensäure. Vor der Operation hielt sich deren Menge in den beiden dahin untersuchten Fällen bei Milchkost in den normalen Grenzen. Nach der Ausschaltung der Pankreasverdauung war in allen drei Versuchen trotz Fleischzufuhr die Kynurensäureausscheidung verschwindend gering. Auch diese Versuche lassen sich nur in dem Sinne deuten, dafs der gröfste Teil der Muttersubstanz der Kynurensäure der Pankreasverdauung seine Entstehung verdankt. Da sie nicht vollständig verschwindet, so bleibt noch die Möglichkeit, dafs ein kleiner Teil durch die peptische Verdauung oder durch Fäulnis im Darm oder durch die im intermediären Stoffwechsel erfolgende Eiweifsspaltung entsteht. Da sowohl für das Pseudopepsin[1]) als auch für das proteolytische Ferment der Leberautolyse die Fähigkeit nachgewiesen ist, ähnlich dem Trypsin Eiweifskörper bis zur Tryptophanbildung und weiter zu zersetzen, so steht dieser Auffassung nichts im Wege. Der in der Norm relativ geringe Umfang dieser Art von Eiweifszersetzung gegenüber der durch das Pankreassekret bei reichlicher Fleischzufuhr im Darm zu stande kommenden dürfte die gefundene quantitative Verschiedenheit ausreichend erklären.

[1]) Glaessner, diese Beiträge 1, 26.

IV.

Zur Kenntnis der tryptischen Eiweifsspaltung.

Von Dr. **Junichi Mochizuki** aus Kioto (Japan).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

1.

Wie aus den Versuchen von E. Salkowski und seinen Schülern, sodann von M. Jacoby[1]) hervorgeht, unterliegen frisch dem Tierkörper entnommene Organe, wenn sie unter Fernhaltung bakterieller Zersetzung bei Brutwärme sich selbst überlassen werden, einer Selbstverdauung (Autolyse), bei welcher ein Teil der vorhandenen Eiweifsstoffe durch einen fermentativen Vorgang zu Tyrosin, Leucin, Glykokoll, Tryptophan, basischen Produkten und Ammoniak aufgespalten wird. Trotz der auffälligen Ähnlichkeit, welche diese Art des Eiweifszerfalls in betreff der Endprodukte mit der Trypsinwirkung darbietet, weist M. Jacoby die naheliegende Identifizierung des von ihm genauer untersuchten proteolytischen Fermentes der Leberautolyse mit dem Trypsin des Pankreas zurück, weil

1. bei der autolytischen Spaltung in jedem Stadium trotz langsamen Verlaufes die Bildung von Albumosen und Peptonen gegenüber der Bildung der Endprodukte sehr zurücksteht;
2. dabei eine Überführung von festgebundenem Stickstoff in locker gebundenen erfolgt, wie sie bei der Trypsinverdauung nicht vorhanden oder doch bisher nicht beobachtet ist;
3. das proteolytische Ferment der Leber auslesend, d. h. nicht auf alle, sondern nur bestimmte Eiweifsstoffe einwirkt.

Von den hier angeführten Unterscheidungsmerkmalen ist das

[1]) Zeitschrift für physiol. Chemie 30, 149.

an zweiter Stelle genannte von besonderer Bedeutung, weil es geeignet ist, die ganz verschiedene Rolle der zwei sonst so ähnlichen proteolytischen Fermente im tierischen Haushalt zu beleuchten. Denn, wie Jacoby andeutet, fällt dem Trypsin die Aufgabe zu, das Nahrungseiweifs der Resorption und Assimilation entgegenzuführen, indes den Fermenten der Autolyse der Abbau des Organeiweifses und die Vorbereitung der Harnstoffbildung obliegt. Dieses Unterscheidungsmerkmal bedarf jedoch, wie auch aus der von Jacoby gewählten Fassung hervorgeht, einer weiteren Sicherstellung.

Die bisher ausgeführten Untersuchungen über die Ammoniakabspaltung durch Trypsin sind nicht der Art, um die Überführung von fest gebundenem Eiweifsstickstoff in Ammoniak bei intensiver und langdauernder Trypsinwirkung sicher auszuschliefsen.

A. Hirschler[1]) unterwarf kleine Mengen (30 bis 50 g) frischen, feuchten Fibrins einer vierstündigen Digestion mit wässerigem Pankreasauszug bei 32° und konnte dabei die Bildung von 0,010 bis 0,021 gr NH_3 auf Kosten des Fibrins nachweisen.

Wegen der Kürze der gewählten Verdauungszeit läfst dieses Resultat eine Verwerthung für die vorliegende Frage nicht zu. Denn bei länger dauernder Digestion hätte eine viel gröfsere Ammoniakmenge auftreten können.

Beweisender sind die von Stadelmann[2]) behufs Nachprüfung der Angaben Hirschlers ausgeführten Versuche, bei denen gekochtes Fibrin der dauernden Einwirkung von Trockenpankreasauszug bei Brutwärme ausgesetzt und eine Störung durch Fäulnis mit Hülfe von Thymol und Salicylsäure hintangehalten wurde. Die erhaltenen Zahlen stehen allerdings den von Hirschler mit geteilten sehr nahe. So konnte in einem Fall bei dreitägiger Verdauung von 35 g Fibrin die Bildung von 0,0208, nach weiterer sechstägiger Verdauung noch von 0,0061 g NH_3 nachgewiesen werden.

Aus diesem Befund ist wohl als sehr wahrscheinlich zu entnehmen, dafs sich die tryptische Ammoniakabspaltung innerhalb sehr enger Grenzen hält und nicht die Menge des im Fibrin präformierten locker gebundenen Stickstoffs übersteigt. Ein sicherer Schlufs wird aber dadurch unmöglich gemacht, dafs im gegebenen Fall weder die Verdauungsdauer bis zur Erreichung eines Maximalwertes fortgeführt, noch auch das Trockengewicht des Fibrins ermittelt wurde, dafs ferner überhaupt über den Gehalt des Fibrins an locker gebundenem Stickstoff Genaueres nicht bekannt ist.

[1]) Zeitschrift für physiol. Chemie 10, 302.

[2]) Zeitschrift für Biologie 24, 261.

Eine Entscheidung der vorliegenden Frage kann dagegen mit aller Sicherheit erreicht werden, wenn ein Eiweifskörper von genau ermitteltem Gehalt an leicht abspaltbarem Stickstoff einer so intensiven Trypsinverdauung ausgesetzt wird, dafs er, ähnlich wie bei Säurespaltung, in seine Endprodukte zerfällt. Hier mufs sich zeigen, ob der durch Säure abspaltbare Stickstoff (Hausmanns Amidstickstoff) ausreicht, das bei der Verdauung abgespaltene Ammoniak zu liefern oder nicht. Einer Aufforderung von Herrn Professor Hofmeister folgend, habe ich einige Versuche in dieser Richtung ausgeführt. Dabei bot sich zugleich die nicht unwillkommene Gelegenheit, zu untersuchen, ob die bereits von Kühne betonte Ähnlichkeit der tryptischen und der Säurespaltung auch in der Stickstoffbindung der dabei erhaltenen Produkte zu Tage tritt.

2. Versuchsanordnung.

Als Material der Verdauung benutzte ich krystallisiertes Serumalbumin aus Pferdeblut. Dasselbe stellt ein homogenes und stets in gleicher Qualität erhältliches Präparat dar und ist — was für vorliegende Versuche besonders von Bedeutung — für Verdauungsfermente besser als andere krystallisierte Eiweifsstoffe angreifbar. Über die darin gegebene Stickstoffbindung war ich durch Hausmann und namentlich durch Herrn cand. med. Gümbel, welcher so freundlich war, mir von seinen Resultaten vor ihrer Publikation Kenntnis zu geben, unterrichtet.

Die Darstellung des Serumalbumins geschah nach der von Gürber, Pemsel und Krieger gegebenen Vorschrift mit Hülfe von Ammonsulfat und Schwefelsäure. Die erhaltenen Krystalle wurden dreimal umkrystallisiert, ihre wässerige Lösung durch Erhitzen auf dem Wasserbad koaguliert, dann der Niederschlag mit heifsem Wasser bis zum Verschwinden der Schwefelsäureaktion ausgewaschen.

Gröfsere Schwierigkeiten bereitete die Gewinnung der benötigten gut wirksamen und doch nicht an Verdauungsprodukten zu reichen Trypsinlösung. Am besten hätte dem angestellten Zwecke eine ganz von stickstoffhaltigen Beimengungen freie Fermentlösung entsprochen. Allein die Versuche, auf einem der bisher gegebenen Wege eine solche zu erhalten, scheiterten. Schliefslich begnügte ich mich mit der Verwendung einer sehr kräftig wirkenden Lösung welche durch anhaltende Selbstverdauung und Alkoholfällung von noch angreifbaren Eiweifskörpern bis auf Spuren befreit war. Dieselbe war in folgender Weise erhalten:

10 Rindspankreas wurden fein zerhakt und unter Toluol 16 Tage bei 40° der Selbstverdauung überlassen; dann wurde filtriert und die

Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen 96prozentigen Alkohols versetzt. Der so erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert und, weil zu viel Verunreinigungen enthaltend, entfernt, das Filtrat nochmals mit dem gleichen Volumen Alkohol gefällt. Der jetzt erhaltene Niederschlag erwies sich als brauchbar. Er wurde abfiltriert, abgepreſst, in Wasser gelöst, 3 Stunden lang gegen fliefsendes Wasser dialysiert, dann neuerdings unter Toluol durch 30 Tage bei 40° der Selbstverdauung überlassen. Die Lösung enthielt dann nur Spuren von koagulablem Eiweifs — wie jede bisher noch so rein hergestellte Trypsinlösung — und löste Fibrin rasch und vollständig.

Die Anordnung der mitzuteilenden Versuche gestaltete sich wie folgt: 2 g völlig trockenes Albumin wurden in einer Kochflasche mit 40 ccm der Pankreaslösung übergossen, dann mit 0,2 ccm einer fünfprozentigen Natriumkarbonatlösung, 160 ccm Wasser und 10 ccm Toluol versetzt, die gut umgeschüttelte Mischung bei 40° zur Verdauung hingestellt. Nach fünf Tagen war der aus Eiweifs bestehende Bodensatz bis auf einen kleinen Rest gelöst. Da dieser in den nächsten Tagen nur noch sehr langsam abnahm, wurde die Verdauung am 10. Tage unterbrochen, das Toluol durch vorsichtiges Abheben und Verdunstenlassen entfernt und die auf 200 ccm gebrachte Flüssigkeit durch ein trockenes Filter filtriert.

Eine Kjeldahl-Bestimmung in dem abfiltrierten und ausgewaschenen Eiweifs ergab die Menge des von Trypsin nicht angegriffenen Stickstoffs.

Vom Filtrate wurden zunächst aliquote Teile (zwei Proben zu 20 ccm) entnommen und darin

1. der durch Destillation mit Magnesia austreibbare,
2. der im Rückstand enthaltene durch Phosphorwolframsäure fällbare,
3. der dann im Phosphorwolframsäurefiltrat verbleibende Stickstoff bestimmt.

In den Einzelheiten des Verfahrens folgte ich der Vorschrift Hausmanns[1]). Wie man sieht, entsprechen die untersuchten Stickstofffraktionen dem Amid-, Monamino- und Diaminostickstoff Hausmanns.

Der unverbrauchte Teil der Verdauungsflüssigkeit wurde in zwei Portionen neuerdings mit Toluol versetzt und der Verdauung bei 40° überlassen. Bei der einen Portion wurde die Digestion nach

[1]) Gegen die von Hausmann zur Bestimmung des Diamino-Stickstoffs angewandte Methodik sind von Kutscher Bedenken erhoben worden. Da dieselben anderenorts ihre Besprechung finden werden, ist für mich keine Nötigung gegeben, darauf einzugehen.

weiteren zehn Tagen, bei der anderen erst nach weiteren 64 Tagen unterbrochen. Beide wurden dann, wie die erst entnommene, in angegebener Weise auf ihre Stickstoffverteilung untersucht.

Die Bestimmungen wurden nach Kjeldahl und zwar unter Zusatz von Kupfer- und Kaliumsulfat vorgenommen. Das Erhitzen mufste bei den salzreichen Flüssigkeiten oft viele Stunden, 15 und mehr, fortgesetzt werden, ehe vollständige Zersetzung eingetreten war.

Da der Stickstoffgehalt der einzelnen untersuchten Proben ein recht geringer war, so wurde auf die Freiheit der Reagentien namentlich auch des destillierten Wassers, von Spuren von Ammoniak besonderes Gewicht gelegt.

3. Versuche.

Nachstehend teile ich die erhaltenen Werte mit. Dieselben stellen zumeist das Mittel von zwei oder mehreren Einzelversuchen dar:

40 ccm der verwendeten Trypsinlösung enthielten im Mittel aus zwei Parallelversuchen:

durch Magnesia austreibbaren Stickstoff	0,0098 g
„ Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoff .	0,0863 g
nicht durch „ „ „ .	0,0700 g
im ganzen	0,1661 g

Nach Abzug dieser Werte von den Stickstoffzahlen, welche direkt aus der Verdauungsflüssigkeit erhalten wurden, ergab sich, dafs aus zwei g Albumin auf das ursprüngliche Volumen umgerechnet, erhalten werden:

	Bei 10täg. Verdauung	Bei 20täg. Verdauung	Bei 74täg. Verdauung
Durch Magnesia austreibbarer N	0,0168	0,0140	0,0182
Durch Phosphorwolframsäure fällbarer N	0,0719	0,1237	0,1167
Nicht durch „ „ „	0,2170	0,1765	0,1749
Stickstoff des unverdauten Restes	0,0203	0,0203	0,0203
Summe	0,3260	0,3345	0,3301

Von diesen Zahlen stimmen die bei 20- und bei 74tägiger Verdauung erhaltenen so weit überein, dafs eine erhebliche Änderung der Stickstoffbindung durch Trypsinwirkung in der Zwischenzeit ausgeschlossen werden kann, hingegen weichen die nach zehntägiger Verdauung erhaltenen Zahlen von beiden so merklich ab, dafs man annehmen mufs, zu diesem Zeitpunkt sei die Verdauung noch nicht ganz abgeschlossen gewesen. Auf die absoluten Zahlen-

werthe möchte ich aber nicht allzu grofses Gewicht legen, weil es sich bei der von mir eingehaltenen Bestimmung des Stickstoffs in aliquoten Teilen der Flüssigkeit vielfach — namentlich beim Amidstickstoff — um sehr kleine Mengen gehandelt hat und der kleinste Versuchsfehler bei Umrechnung auf das Gesamtvolumen einen grofsen Einflufs auf das Endresultat ausübt. Diese Fehlerquelle hätte sich durch Verwendung gröfserer Eiweifs- und Flüssigkeitsmengen leicht vermeiden lassen. Leider hat es mir die meinem Aufenthalt in Strafsburg zugemessene Zeit nicht gestattet eine neue Versuchsreihe durchzuführen. Für die eingangs erörterte Frage ist das übrigens ohne Belang.

4. Versuchsergebnisse.

Für einen Vergleich des Verhaltens des Stickstoffs bei der Trypsinverdauung mit jenem bei der Säurespaltung ist natürlich die möglichst intensive Verdauungswirkung — also der 74 tägige Versuch — heranzuziehen. Dieser ist überdies derjenige, den ich nach dem tadellosen Übereinstimmen der Kontrollproben für den bestgelungenen halte. Berechnet man in diesem Versuch aus dem in der Verdauungslösung gefundenen Stickstoff, wieviel davon prozentisch auf die einzelnen Stickstofffraktionen entfällt, so erhält man folgende Werte:

	g	Proz.
Gesamt-N.	0,3098	100
Davon		
Durch Magnesia austreibbar	0,0182	5,9
Durch Phosphorwolframsäure fällbar . .	0,1167	37,6
Nicht durch Phosphorwolframsäure fällbar	0,1749	56,5

Zum Vergleiche stelle ich die von Herrn Gümbel für die Säurespaltung des krystallisierten Serumalbumins gefundenen Zahlen daneben:

Durch Magnesia austreibbarer Stickstoff . .	6,50	Proz.
Melaninstickstoff.	1,03	„
Durch Phosphorwolframsäure fällbar . . .	33,36	„
Nicht durch Phosphorwolframsäure fällbar .	60,20	„

Wie man sieht, fällt die bei langdauernder Trypsineinwirkung abgespaltene Ammoniakmenge in beiden Fällen nahezu zusammen, d. h. im Serumalbumin ist fast genau jener Teil des Stickstoffs, welcher sich als durch Säure abspaltbar erweist, auch für das Trypsin abspaltbar, jedenfalls nicht mehr Hieraus geht hervor dafs das Trypsin nicht die Fähigkeit besitzt, wie das proteolytische

Ferment Jacobys, fest gebundenen Stickstoff in locker gebundenen überzuführen, und dafs der von Jacoby hervorgehobene wichtige physiologische Unterschied in der Wirkungsweise des tryptischen Ferments der Verdauung und jenes der Autolyse vollauf zu Recht besteht.

Weiter wird aber hiermit auch der etwa gehegte Zweifel beseitigt, ob der bei Säurespaltung gefundene locker gebundene Stickstoffanteil in der That schon im intakten Eiweifsmolekül in anderer Bindungsform vorhanden sei als der übrige Stickstoff. Denn wenn man bei der intensiven Wirkungsweise konzentrierter Säuren ein solches Bedenken hegen und derselben eine künstliche Verschiebung der Stickstoffverteilung zumuten kann, so wird man bei dem, soweit bekannt, rein hydrolytisch wirkenden Trypsin eine ähnliche gewaltsame Wirkung nicht anzunehmen geneigt sein.

Dafs es sich übrigens bei dem durch Trypsinwirkung erhältlichen, mittels Magnesia austreibbaren Stickstoff — wie bei dem Amidstickstoff der Säurespaltung — um Ammoniak handelt, wurde in Vergleichsversuchen festgestellt, in denen teils durch Trypsinverdauung von rohem Hühnereiweifs, teils durch Selbstverdauung von Trockenpankreas erhaltene Lösungen einerseits der Destillation mit Magnesia, andererseits der Ammoniakbestimmung nach Schlösing unterworfen wurden. Die dabei erhaltenen Ammoniakwerte stimmten innerhalb der unvermeidlichen Fehlergrenzen überein, vorausgesetzt, dafs die nach Schlösing ausgeführten Proben zum mindesten vier Tage vor der Titration gestanden hatten.

Mehr als die Werte für den Amidstickstoff weichen die Werte für Monamino- und Diaminostickstoff voneinander ab, und zwar sind die für Diaminostickstoff bei Trypsinspaltung erhaltenen etwas höher, auch wenn man, wie das Hausmann gethan hat, den Melaninstickstoff der Säurespaltung als dem Diaminostickstoff zugehörig behandelt. Immerhin läfst sich auch hier ein Parallelismus zwischen beiden Formen der Zersetzung, wie ihn schon Kühne hervorgehoben hatte, nicht verkennen. Dafs die Werte für den durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoff bei Trypsinspaltung höher ausfallen, dürfte übrigens kein zufälliger Befund sein; denn, wie mir Herr Professor Hofmeister mitzuteilen gestattet, haben im hiesigen Institut ausgeführte Versuche das Auftreten von Basen bei aseptischer tryptischer Verdauung sichergestellt, welche bei Säurespaltung nicht gefunden wurden.

V.

Aus dem pharmakologischen Institut zu Heidelberg.

Über Ricin-Immunität.

Von Dr. **Martin Jacoby**, Assistent des Instituts.

Ehrlich[1]) machte 1891 die Entdeckung, dafs man Versuchstiere gegen hohe Dosen des in dem Ricinussamen enthaltenen heftigen Giftes immunisieren kann, und zeigte gleichzeitig, dafs das Serum der immunisierten Tiere ähnlich wie nach der Einverleibung der Bakteriengifte ein spezifisches Antitoxin enthält. Damit stand die Antitoxinbildung gegenüber den Bakteriengiften nicht mehr völlig vereinzelt da und es war zu erwarten, dafs das Studium der Immunität gegen Ricin und einige ähnliche Pflanzengifte sich auch für die Erforschung des Immunisierungsvorganges bei Bakteriengiften fruchtbringend erweisen würde. In der That konnte Ehrlich auf Grund der beim Ricin festgestellten Thatsachen zuerst die Erkenntnis gewinnen, dafs genau verfolgbare quantitative Beziehungen die Einwirkung des Antitoxins auf das Gift beherrschen, und durch Übertragung dieser Erkenntnis auf die Immunisierungsvorgänge bei der Diphtherie und Tetanus wurde ein wesentlicher Schritt zur Begründung der Serumtherapie gethan.

Seit der Entdeckung der Ricin-Immunität ist nun durch das Studium der Bakterientoxine, der Hämolysine, Cytotoxine u. s. w. ein weit klarerer Einblick in die Vorgänge bei der Immunisierung erreicht worden. Es erscheint deshalb aussichtsvoll, die Versuche mit dem leicht zugänglichen Ricin wieder aufzunehmen. Die leitenden Gesichtspunkte waren dabei: erstlich, die Ricin-Immunität von dem nunmehr gewonnenen Standpunkt der Immunitätslehre

[1]) Deutsche mediz. Wochenschr. 1891.

aus einer experimentellen Analyse zu unterwerfen, zweitens konnte der Versuch gemacht werden, die heute zur Trennung von Eiweifskörpern und Fermenten ausgebildeten Methoden auch zum Studium der Toxine und Antitoxine zu verwerten, in welcher Richtung ja bereits einige Erfahrungen vorliegen.

Litteratur über Ricin-Immunität.

Der Mitteilung der eigenen Befunde möge eine Zusammenstellung einiger Eigenschaften des Ricins vorausgeschickt werden, welche für die Frage der Ricin-Immunität von Interesse sind, vor allem möge auf die weitgehenden Analogieen hingewiesen werden, welche das Gift mit manchen Bakterientoxinen zeigt. In Bezug auf die chemische Natur des Ricins sei auf eine demnächst erscheinende Mitteilung verwiesen [1]). Stillmark [2]) hat die giftige Substanz aus dem Ricinussamen nach den zur Fällung von Eiweifskörpern üblichen Methoden gewonnen und sah das Ricin als einen Eiweifskörper an. Doch konnte ich zeigen, dafs man bei weiterer Isolierung mit Hülfe von Trypsinverdauung zwar dem Gifte seinen kolloiden Charakter nicht nehmen kann, wohl aber eine völlige Trennung von eigentlichen Eiweifskörpern erreicht. Das Ricin behält bei dieser Reinigung seine Giftigkeit quantitativ unverändert, giebt aber auch in konzentrierter Lösung die eigentlichen Eiweifsreaktionen nicht mehr. Bei manchen Bakteriengiften dürften die Verhältnisse ähnlich liegen, indem ihre kolloide Natur feststeht, ihr Eiweifscharakter aber zum mindesten zweifelhaft erscheint.

Von den Wirkungen des Ricins beansprucht vor allem das interessante von Kobert und Stillmark entdeckte Phänomen Interesse, dafs das Gift überlebendem Blute zugesetzt in eigenartiger Weise die roten Blutkörperchen zur Verklebung bringt, dieselben agglutiniert. Dafs auf dieser Blutwirkung auch die letale Wirkung des Ricins im Tierkörper beruht, darf als widerlegt gelten. Vielmehr bietet die toxische Wirkung, wie namentlich Müller [3]) in einer Arbeit aus dem hiesigen Institut gezeigt hat, die gröfste Analogie mit der Wirkung gewisser Bakteriengifte, indem, wie etwa beim Diphtheriegift, nach einer Latenzzeit von vielen Stunden das Centralnervensystem ergriffen wird und sich dann rasch eine Lähmung des Athemcentrums und der vasomotorischen Centren

[1]) Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm. 46, p. 28—40 (1901).
[2]) Arbeiten des pharmakologischen Instituts zu Dorpat 3 (1889).
[3]) Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 42, 302—322 (1899).

entwickelt. Auch die wohl zuerst von Ehrlich beschriebene nekrotisierende und entzündungserregende Wirkung an der Applikationsstelle teilt das Ricin mit manchen Bakteriengiften.

Da somit die agglutinierende Blutwirkung dem Gifte neben anderen toxischen Wirkungen im Tierkörper zukommt und sich die letzteren nicht auf das Phänomen der Blutkörperchenverklebung zurückführen lassen, entstand die Frage, ob beide Giftwirkungen ein und demselben Körper eigen sind oder ob das Ricin ein Toxin und ein Agglutinin nebeneinander enthält. Kobert und Stillmark, welche die toxische Wirkung auf die Blutwirkung zurückführten, nahmen ein einheitliches Gift an. Cushny[1]) und Müller hingegen bestreiten die Identität beider Giftwirkungen. Es wird sich in folgendem zeigen, dafs das Studium des Immunisierungsvorganges Anhaltspunkte zur Beurteilung dieser Frage bietet und den komplizierten Sachverhalt einigermafsen aufzuklären vermag.

An die agglutinierende Wirkung des Ricins knüpften weitere Immunisierungsstudien von Ehrlich[2]) an, welche zeigten, dafs das Serum immunisierter Tiere mit Ricin gemischt die zerstörende Wirkung auf Erythrocyten aufhebt, und dafs die gleiche Quantität Immunserum zur Neutralisation der toxischen wie auch der agglutinierenden Wirkung des Giftes erforderlich ist.

Ricin-Immunität ist bereits bei verschiedenen Versuchstieren erzielt worden, namentlich bei Mäusen, Kaninchen und Ziegen. Man kann die Immunisierung sehr hoch treiben, so dafs die Tiere schliefslich viele Hunderte tödlicher Dosen ohne allgemeine Reaktion vertragen und ein Kubikcentimeter ihres Serums mehrere solche Dosen vollkommen neutralisiert.

In dieser Arbeit wurden als Versuchstiere immer Kaninchen benutzt, deren Immunisierung nach den Ehrlichschen Vorschriften durchgeführt wurde. Die Tiere wurden erst mit Gift gefüttert, dann subkutan so lange weiter behandelt, bis man ihnen 200 bis 300 mg bei einem Körpergewicht von 2 bis 3 kg subkutan ohne allgemeine Reaktion injizieren konnte, während die letale Dosis pro Kilogramm für ein normales Tier 0,5 mg Ricin beträgt. Wegen der grofsen Giftigkeit des Ricins erfordert diese Vorbehandlung etwa vier Monate Zeit.

Versuche zur Isolierung des Antiricins.

Da es noch unentschieden ist, ob die beiden Wirkungen des Ricins — die toxische Allgemeinwirkung und die agglutinierende Blutwirkung — einer einheitlichen Substanz angehören, so läfst

[1]) Arch. f. exp. Path. und Pharm. 41, 439—448 (1898).

[2]) Fortschritte der Medizin 1897.

sich um so weniger a priori etwas darüber aussagen, ob man einen Antikörper oder ein Antitoxin und ein Antiagglutinin zu erwarten hat. Da mir eine Trennung zweier Antikörper jedoch nicht gelungen ist, vielmehr die antitoxische und die antiagglutinierende Eigenschaft des Blutserums in allen Isolierungsversuchen vereint blieben, so brauchen wir bei der Schilderung dieser Versuche zunächst nur mit einer Substanz, mit einem Antiricin zu rechnen.

Nach den Erfahrungen, die bei anderen Kolloiden gemacht worden sind, schien es am zweckmäfsigsten, die Isolierung mit der fraktionierten Aussalzung zu beginnen. Diese Methode führte in der That zum Ziel, indem es bei sechs hochimmunen Kaninchen stets gelang, die Antikörper in einer eng umgrenzten Fraktion des Serums nachzuweisen.

Zwei Beispiele mögen das illustrieren:

1 ccm Serum eines $2^1/_2$ kg schweren Kaninchens, das subkutan 250 mg Ricin vertrug (das ist die letale Dosis für 500 kg Kaninchen), entgiftet 4 mg Ricin vollständig.

Aus diesem Serum wird die Fraktion hergestellt, die mit Ammonsulfat bei Sättigung $^1/_4$ bis $^1/_3$ ausgesalzen wird.

Von dieser Fraktion, die auf das ursprüngliche Volumen gebracht wird, entgiftet wiederum 1 ccm 4 mg Ricin vollständig.

Die übrigen, zum Teil voluminösen Fraktionen des Blutserums sind völlig wirkungslos.

1 ccm Serum eines 3 kg schweren Kaninchens, welches subkutan 200 mg Ricin vertrug (das ist die letale Dosis für 400 kg Kaninchen), neutralisiert das Agglutinationsvermögen von 1 mg Ricin vollkommen.

Die daraus hergestellte Fraktion, die bei $^1/_4$ bis $^1/_3$ Sättigung mit Ammonsulfat entsteht, neutralisiert ebenfalls vollkommen das Agglutinationsvermögen von 1 mg Ricin.

Die übrigen Fraktionen sind wirkungslos.

Das Antiricin läfst sich also fraktioniert aussalzen und geht quantitativ in die Fraktion über, die zwischen $^1/_4$ und $^1/_3$ Sättigung mit Ammonsulfat ausgefällt wird. Die fraktionierte Aussalzung bedeutet in diesem Falle einen erheblichen Schritt auf dem Wege der Isolierung, weil die Fraktion nur einen kleinen Anteil der kolloiden Substanzen des Serums umfafst.

Ähnliche Erfahrungen liegen für das Tetanus- und Diphtherie-Antitoxin bereits vor.

Tizzoni [1]) konnte mit Magnesiumsulfat das Tetanusantitoxin quantitativ aussalzen, Brieger und Ehrlich [2]) fanden es in der Milch fast vollständig in jener Fraktion, die bei einer Ammonsulfatkonzen-

[1]) Festschrift für Virchow 3, 1891.

[2]) Zeitschrift für Hygiene 12. Citiert nach Ide und Lemaire.

tration von 27 bis 30 Proz. ausfiel, das Filtrat enthielt dann nur Spuren des Antitoxins.

Freund und Sternberg[1]), sowie Seng[2]) konnten auch Diphtherieantitoxin mit Magnesiumsulfat aussalzen, ebenso ging es bei Halbsättigung mit Ammonsulfat in den Niederschlag. Ide und Lemaire[3]) fanden das gesamte Antitoxin des Diphtherieheilserums in der Fraktion, die durch Ammonsulfatsättigung von 26 bis 44 Proc. ausfällt.

Da sich mir beim Ricin die Methode bewährt hatte, durch Behandlung des fraktionierten Giftes mit fraktioniertem Trypsin das Ricin von fremden Beimengungen zu trennen, so lag es nahe, das gleiche Verfahren auch auf die Isolierung der Antikörper zu übertragen. Hierfür liegen bei dem Antiricin infolge seiner niedrigen Fällungsgrenzen die Bedingungen günstig. Die Versuche hatten ein positives Resultat.

10 ccm einer Antitoxinlösung, die durch Ammonsulfatfraktionierung gewonnen war, werden 7 Tage mit 20 ccm einer fraktionierten Trypsinlösung[4]) im Brütschrank gehalten. Dann wird durch Eintragen von Ammonsulfatlösung eine Salzsättigung von 33 Proc. hergestellt, der entstehende Niederschlag wird mit entsprechender Salzlösung gewaschen, schliefslich wieder in 10 ccm Wasser gelöst.

1 ccm der Lösung neutralisiert vorher und nachher vollständig die toxische und agglutinierende Ricinwirkung von 1 mg Ricin.

Es ändert also längere Einwirkung von Trypsin nichts an den Fällungsgrenzen und nichts an den specifischen Wirkungen der Antikörper. Damit ist die Aussicht nahe gerückt, gröfsere Quantitäten des Antiricins vollständiger, als es bisher möglich war, von den begleitenden Kolloiden zu trennen. Entsprechende Versuche sind mit Antiricin im Gange, das durch Immunisierung von Ziegen gewonnen wurde.

Auch in Bezug auf die hohe Widerstandsfähigkeit gegen die Verdauung scheint eine Analogie zwischen dem Antiricin und den Bakterienantitoxinen zu bestehen, da auch diese nach Buchner[5]) der Verdauung nicht zugänglich sind.

---

[1]) Zeitschrift für Hygiene 31, 429—432 (1899).

[2]) Daselbst.

[3]) Arch. de Pharmakodynamie 6, 1899.

[4]) Diese Trypsinlösung wurde so hergestellt, dafs durch Aussalzung von autolysierten Rinderbauchspeicheldrüsen bei $^{65}/_{100}$ Sättigung die dabei ausfallenden Eiweifskörper entfernt und dann das Ferment durch Ganzsättigung mit Ammonsulfat und Dialyse aus dem Filtrat isoliert wurde. (S. Arch. f. exper. Path. u. Pharmak. 46, 36.)

[5]) Münchener med. Wochenschr. 1894.

Die beim Ricin[1]), wenigstens solange es nicht vom Eiweifs getrennt ist, und beim Antiricin beobachtete, erhebliche Resistenz gegen die Trypsinverdauung führt nicht nur zu dem praktischen Resultat einer vollständigeren Isolierung, sondern bietet auch einiges theoretisches Interesse. Da die Möglichkeit besteht, dafs diese Resistenz darin begründet ist, dafs den Substanzen die Struktur mangelt, welche als Angriffspunkt für das Ferment nötig ist, so ist ein Hinweis auf einen analogen Fall von Interesse. Schwarz[2]) hat neuerdings mitgeteilt, dafs Aldehydeiweifsverbindungen gegen Trypsin resistent sind, und gelangte zu der Anschauung, dafs Trypsin an derselben Stelle des Eiweifsmoleküls angreift, an der die Aldehydgruppe eintritt. Nun habe ich, an die Mitteilung von Salkowski[3]) anknüpfend, wonach das Diphtherietoxin eine gewisse Schädigung durch Salicylaldehyd erleidet, eiweifshaltige Ricinlösungen mit Salicylaldehyd behandelt, um vielleicht auf diesem Wege Ricintoxoide darzustellen. Es ergab sich jedoch, dafs Salicylaldehyd, ebenso wie Trypsin, in keiner Weise die Giftigkeit des eiweifshaltigen Ricins herabsetzt, während das eiweifsfreie Ricin noch nach dieser Richtung geprüft werden mufs.

Das Verhalten von Toxinen und Antitoxinen gegenüber proteolytischen Fermenten hat auch weiterhin dadurch an Interesse gewonnen, dafs man neuerdings, dem Vorgange Buchners folgend, derartigen Enzymen eine Stelle in den Toxin- resp. Antikomplexen einräumt. Für die Bakterientoxine, Antitoxine, das Ricin und Antiricin liegt jedenfalls kein Anlafs vor, sich entsprechende Vorstellungen zu bilden. Erwähnen möchte ich hier Beobachtungen, welche zeigen, dafs das gegen Trypsin noch resistente Ricin auch dann nicht durch das Ferment zerstört wird, wenn beide durch ein Bindeglied einander genähert werden.

Die Frage wurde mit folgender Versuchsanordnung geprüft:

Cushny hat beobachtet, dafs gelöstes Ricin sich auf Fibrin niederschlägt, so dafs es durch Wasser oder Kochsalzlösung nicht, wohl aber durch Soda wieder in Lösung gebracht werden kann. Derartige mit Ricin beladene Fibrinflocken habe ich nach den Angaben Cushnys hergestellt und sie gut ausgewaschen in Trypsinlösung gebracht. Aber auch das so fixierte Ricin widerstand der Einwirkung des Trypsins. Das Fibrin wurde allmählich verdaut, dabei ging Ricin in Lösung, wurde aber nicht zerstört.

[1]) Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 46.

[2]) Zeitschrift f. physiol. Chemie 31.

[3]) Berliner klin. Wochenschr. 1898.

Versuche über die Resistenz des Antiricins.

Auch nach anderen Richtungen fand sich eine sehr hohe Resistenz des Antiricins gegen äufsere Eingriffe. Folgende Versuche wurden angestellt:

1. Zweistündiges Erhitzen auf 60°.

2. Halbstündige Einwirkung von Schwefelsäure bei 37°.

Gleiche Teile Antitoxinlösung und $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure werden zusammengebracht, am Schlusse neutralisiert.

3. Halbstündige Einwirkung von Natronlauge bei 37°.

Gleiche Teile Antitoxinlösung und $^1/_{10}$-Normalnatronlauge werden zusammengebracht, am Schlusse neutralisiert.

4. Einstündige Einwirkung von Pepsinsalzsäure bei 35°. Alle diese Eingriffe, auch hintereinander angewandt, schwächten weder das Antitoxin noch das Antiagglutinin ab; die gleiche Menge Immunserum hatte vor und nach der Behandlung das gleiche Neutralisationsvermögen für die agglutinierende Blutwirkung sowie für die Giftigkeit bei der Injektion.

Dagegen widerstand das Antiricin der einstündigen Erhitzung auf 60° bei saurer Reaktion nicht.

5 ccm Antiricin werden mit 3 ccm $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure eine halbe Stunde bei 60° gehalten, dann wird neutralisiert. Es fällt Eiweifs aus, welches sich auch bei der Neutralisation nicht wieder löst, das Filtrat ist wirkungslos, normales Kaninchenblutserum vermag das Antiricin nicht zu reaktivieren.

Das Antiricin ist also sehr resistent gegen die verschiedensten Eingriffe, bedeutend widerstandsfähiger als andere Reaktionsprodukte, die im Organismus bei geeigneter Vorbehandlung mit anderen Substanzen in die Erscheinung treten, z. B. widerstandsfähiger als die bei Behandlung mit fremden Blutkörperchen entstehenden Hämolysine und die durch Vorbehandlung mit Hämolysinen gebildeten Antihämolysine. Diese höhere Resistenz spricht für eine relativ geringere Komplexität des Aufbaues, und danach wird man das Antiricin im Vergleich zu anderen ähnlichen Reaktionsprodukten des Organismus als einen relativ einfach gebauten Körper ansehen dürfen. Auch bei den Bakterien-Antitoxinen scheinen, nach der Resistenz gegen die oben angeführten Eingriffe beurteilt, ähnliche Verhältnisse vorzuliegen. Dagegen konnten Bordet sowie Ehrlich und Morgenroth für die ungleich labileren Hämolysine eine grofse Komplexität des Aufbaues nachweisen. Auch Ehrlich[1]) kommt bei der allgemeinen theoretischen

[1]) Schlufsbetrachtungen in Nothnagels Handbuch 1901.

Formulierung des in diesen Fragen bisher vorliegenden Materials zu der Anschauung, dafs die Antitoxine im engeren Sinne relativ einfach gebaute Körper sind. Er schreibt ihnen im Gegensatz zu den Hämolysinen u. s. w. nur eine haptophore Gruppe und keinerlei Nebengruppen zu und bezeichnet sie deshalb als „einfache Uniceptoren". Dagegen bilden die mitgeteilten Beobachtungen über die Resistenz des Antiricins keine Stütze für die in der Litteratur immer wiederkehrende Ansicht, nach der nähere Analogieen zwischen den Antitoxinen und Fermenten bestehen.

Über einige Eigenschaften des Ricin-Immunblutes.

Das Verhalten des antiricinhaltigen Immunblutes ist nach anderen Richtungen bisher wenig untersucht worden. Die einzigen Angaben, die ich in der Litteratur gefunden habe, entnehme ich dem Merckschen Jahresbericht von 1900. Danach untersuchte Stepanoff (Wratsch 1900, Nr. 4) das qualitative und quantitative Verhalten der Leukocyten bei immunisierten Tieren.

Das Blut unserer hochimmunen Tiere zeigte einige bemerkenswerte Eigentümlichkeiten. Zunächst ergaben sich in Bezug auf die Gerinnung gewisse Abweichungen von der Norm. Während nach Müller bei der akuten Vergiftung das Blut ziemlich schwer gerinnt, trat bei einigen meiner Immuntiere so leicht Gerinnung auf, dafs die Entnahme des Blutes aus der Carotis Schwierigkeiten bereitete; die Gerinnung kam sogar zu stande, wenn man 5 ccm Blut in 95 ccm 0,92prozentiger Kochsalzlösung, in der 0,5 g citronensaures Natron gelöst war, einlaufen liefs. Bereits einige Zehntel Kubikcentimeter des Serums der Tiere genügten, um normales durch citronensaures oder auch oxalsaures Natron ungerinnbar gemachtes Blut zur langsamen, aber ziemlich vollständigen Gerinnung zu veranlassen. Die antitoxisch wirksame, durch Ammonsulfat isolierte Fraktion des Serums verhielt sich ebenso. Kontrollversuche mit normalem Serum zeigten, dafs vielleicht auch grofse Mengen desselben bei der Mischung mit ungerinnbar gemachtem Blute eine Andeutung des Gerinnungsphänomens hervorrufen; jedenfalls aber ist der quantitative Unterschied gegenüber Antiricinserum ein enormer, da von diesem schon Bruchteile eines Kubikcentimeters genügten, um ziemlich vollständige Gerinnung zu erzielen. Milch wurde durch Antiricinserum nicht zur Gerinnung gebracht.

Während im normalen Kaninchenblutserum in der betreffenden

Ammonsulfatfraktion nur wenig Eiweifs ausgesalzen wird und dieses zum Teil noch aus echtem Globulin (Euglobulin von Fuld und Spiro[1]) besteht, ist bei den Immuntieren diese Fraktion sehr grofs und enthält eine reichliche Quantität wasserlöslichen Globulins (Pseudoglobulins).

Auch für das Diphtherie-Antitoxinblut sind Unterschiede im Verhalten der Eiweifskörper gegenüber der Norm von Seng[2]) beobachtet worden. Das lösliche Globulin des Immunblutes, welches in die gleiche Fraktion mit dem Antitoxin geht, koagulierte erst bei höherer Temperatur als das entsprechende Globulin des normalen Pferdeserums und zeigte eine andere spezifische Drehung.

Über eine specifische Reaktion des Ricin-Immunblutes.

Bringt man eine klare Ricinlösung mit einer geringen Quantität Immunserum zusammen, so entsteht eine Trübung, die sich allmählich als ein flockiger Niederschlag absetzt. Beim Mischen von Ricin mit normalem Blutserum entsteht zwar auch eine Trübung, die aber sehr geringfügig ist und auf keinen Fall mit der Niederschlagsbildung im Immunserum verwechselt werden kann. Die gleiche Fällung wie im Immunserum entsteht auch beim Zusammenbringen der Ricinlösung und jener durch Aussalzung des Immunserums gewonnenen Fraktion, welche das Antiricin enthält; alle anderen Fraktionen sind unwirksam. Vor Verwechslungen mit anders gearteten Ausfällungen durch Salz- und Wasserzusatz ist man durch entsprechende Kontrollversuche ohne Schwierigkeit geschützt. Durch Kochen geschädigtes Ricin giebt mit wirksamem Antiricin, sowie umgekehrt zerstörtes Antiricin mit wirksamem Ricin die Reaktion nicht mehr.

Die Reaktion der Niederschlagsbildung stellt sich somit jedenfalls als eine Immunitätsreaktion dar, da sie im normalen Serum fehlt und nur im Immunserum mit der Substanz eintritt, gegen welche immunisiert worden ist.

Da weder die Ricinlösung die Lösung einer reinen, chemisch wohl charakterisierten Substanz ist, noch die betreffende Fraktion nur einen Körper enthält, so mufs die Frage aufgeworfen werden, welche Substanzen an der auffälligen Reaktion beteiligt sind.

Zunächst wäre es denkbar, dafs die in Rede stehende Immunitätsreaktion gar nicht der Ausdruck der Ricinimmunität wäre, sondern einer gleichzeitigen Antikörperbildung gegen Eiweifs-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 31, 132—155 (1900).
[2]) Zeitschr. f. Hygiene 31 (1899).

substanzen, welche neben den eigentlichen Giftstoffen in dem ungereinigten Ricin enthalten waren, das zur Vorbehandlung verwendet wurde. Aus den Untersuchungen des letzten Jahres ist ja bekannt, dafs nach Vorbehandlung mit verschiedenen Eiweifssubstanzen das Serum von Tieren die Fähigkeit erlangt, mit den betreffenden Proteïnen specifische Fällungen zu geben. Es wäre somit möglich, dafs die das Toxin im Ricin begleitenden Eiweifskörper das Auftreten derartiger specifischer Körper, sogenannter „Koaguline" veranlassen, wenn das zur Immunisierung benutzte Ricin ebenso wie das zur Anstellung der Reaktion verwandte kein chemisch reines Ricin war. Eine solche Auffassung erscheint aber deshalb ausgeschlossen, weil auch das durch Trypsin gereinigte Gift, welches keinerlei Eiweifsreaktionen mehr zeigt, in einer so kleinen Menge, dafs ein Rückstand gar nicht nachweisbar wäre, eine voluminöse Fällung mit dem Immunserum giebt.

Es ist somit in hohem Grade wahrscheinlich, dafs an dem Zustandekommen der Reaktion das Ricin und Antiricin selbst beteiligt sind. Dabei läge es am nächsten, an die Entstehung einer schwer löslichen Verbindung von Ricin mit seinem Antikörper zu denken. Eine so einfache Erklärung ist aber durch die Massigkeit des ausfallenden Niederschlages ausgeschlossen. Denn die in Rede stehenden Mengen von Ricin und Antiricin selbst sind sicherlich viel zu gering, um für sich allein eine sichtbare Reaktion veranlassen zu können. Man dürfte somit der Wahrheit am nächsten kommen, wenn man die Niederschlagsbildung als eine Reaktion zwischen Ricin und Antiricin auffafst, dabei aber annimmt, dafs aufser diesen specifischen Substanzen auch andere Bestandteile des Immunserums in den Niederschlag hineingehen

So wird also die Reaktion zwischen Antiricin und Ricin im Serum dadurch zu einem sichtbaren Phänomen, dafs noch andere Stoffe des Serums mitgerissen werden. Wenn wir nun im Anschlufs an Ehrlichs Nomenklatur das Antiricin als einen Receptor bezeichnen, so könnten wir uns so ausdrücken, dafs das Ricin bei der Reaktion mit seinem Receptor andere eiweifsartige Bestandteile des Serums mitreifst. Formuliert man den Befund derartig, so leuchtet sofort die vollkommene Analogie mit der Reaktion ein, welche das Ricin mit den roten Blutkörperchen giebt. Auch hier werden Eiweifskörper, z. B. das gesamte Hämoglobin, mit niedergerissen, während aus den übereinstimmenden Angaben von Stillmark, Kobert, Müller und Ehrlich hervorgeht, dafs an der eigentlichen Reaktion lediglich das Stroma der

Zellen beteiligt ist. Sicherlich stellen hier die eigentlichen Receptoren auch nur Substanzen dar, die in minimaler Menge vorhanden sind. Das wesentliche Resultat dieser Ausführungen gipfelt also darin, dafs wir beim Ricin im Immunserum derartige sichtbare Receptorenreaktionen beobachten können, während beim normalen Tier Ähnliches nur bei der Einwirkung des Ricins auf Zellen zu konstatieren ist.

Wir hätten somit in der beobachteten Reaktion einen Ausdruck der von Ehrlich als wesentlich für die Immunisation und Antitoxinbildung angenommenen Receptorenwanderung aus den Zellen des Organismus in die Körperflüssigkeiten. Um Mifsverständnissen vorzubeugen, sei besonders betont, dafs natürlich durchaus nicht behauptet werden soll, dafs die bei den Immuntieren vorhandenen Serumreceptoren aus den roten Blutkörperchen stammen. Es soll nur darauf hingewiesen werden, dafs eine gewissermafsen typische Receptorenreaktion sich beim normalen Tier nur als celluläre, beim Immuntier aber auch in den Körperflüssigkeiten abspielt.

Betrachtet man nun die Frage von einer ganz anderen Seite, so kommt man ebenfalls zu der Auffassung, dafs die Niederschlagsbildung von der eigentlichen Ricineinwirkung nicht zu trennen ist, und dafs das Ricin nicht etwa von einem sich bildenden Niederschlag nur mitgerissen wird. Es läfst sich vielmehr durch genaueres Verfolgen der Reaktion eine Stütze für die Anschauung erbringen, dafs das Ricin mit dem Antiricin eine chemische Bindung eingeht, eine Anschauung, wie sie vielfachen Einwürfen gegenüber Ehrlich stets für die Toxin-Antitoxinbindung vertreten hat. Man hat gegenüber Ehrlich immer wieder eingewandt, dafs auch physikalische Adsorption bei der Toxinentgiftung eine Rolle spielen könnte. Eine derartige Vorstellung wäre beim Ricin insofern plausibel, als wir durch Cushny wissen, dafs dasselbe ähnlich den Fermenten in hohem Grade die Eigenschaft besitzt, von Niederschlägen mitgerissen zu werden. Ebenso wie nun Ricin nach Cushny ausgefällt wird, wenn man durch normales Blutserum, das Ricin enthält, Kohlensäure leitet, also einen Eiweifsniederschlag erzeugt, so könnte man daran denken, dafs die Entgiftung durch Immunserum sich sekundär an eine derartige Ausfällung anschliefst. Durch „Ausfällung“ verliert jedoch Ricin seine Giftwirkung nicht, der Niederschlag bleibt giftig, so konnte z. B. Tichomiroff[1])

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 21 (1895).

zeigen, dafs durch Nukleïnsäure ausgefälltes Ricin noch toxisch war. Jedenfalls aber verläuft eine Entgiftung durch Ausfällung, wie sie zu stande kommt, wenn eine Substanz durch einen sich bildenden Niederschlag mitgerissen wird, kaum in der Art quantitativ, wie die Entgiftung des Ricins durch das Immunserum. Bereits seit Ehrlich ist ja schon bekannt, dafs man Ricin und Antiricin genau durch Mischung neutralisieren, also exakt bestimmen kann, wieviel Kubikcentimeter eines Immunserums nötig sind, um eine gewogene Menge Ricin zu entgiften. Wenn man eine Spur Gift mehr hinzufügt, so ist diese durch die toxische Wirkung auf den Tierkörper nachweisbar. Filtrierte ich nun bei Versuchen, in denen auch nur geringe Quantitäten Ricin im Überschufs zugesetzt waren, von dem bei der Mischung mit dem Serum entstandenen Niederschlage ab, so liefs sich das überschüssige Gift im Filtrat nachweisen. Es wurde also nur so viel ausgefällt als entgiftet. Auch bei der Betrachtung der Verhältnisse von dem Gesichtspunkte der Entgiftung aus kommen wir demnach zu dem Resultat, dafs es sich hier um eine wahre Ricin-Antiricinreaktion handelt und nicht um eine mechanische Niederreifsung des Giftes mit einem fremden Niederschlage.

Über das Verhalten der Zellen bei der Immunisation.

Wie verhalten sich nun die intakten roten Blutkörperchen bei den Hoch-Immuntieren? Kossel[1]) und Camus und Gley[2]) haben für die Aalblutvergiftung gezeigt, dafs die roten Blutkörperchen hoch-immunisierter Tiere, auch wenn sie in einem völlig antitoxinfreien Medium schwimmen, nicht mehr vom Gifte angegriffen werden, also nach Ehrlichs Nomenklatur keine Receptoren mehr besitzen.

Anfangs glaubte ich, beim Ricin Ähnliches festgestellt zu haben. Untersucht man nämlich gut gewaschene Körperchen von Immuntieren etwa zwei Tage nach der Blutentnahme, so sieht man nur eine mäfsige Niederschlagsbildung[3]), aber keine Agglutination mehr. Das hängt aber mit postmortalen Veränderungen der Blutkörperchen zusammen, mit den Prozessen, die zum Lackfarbigwerden des Blutes führen. Denn bei frischer Untersuchung

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1898.

[2]) Arch. de pharmakodynamie 5.

[3]) Diese Niederschlagsbildung ist die Reaktion des Ricins mit den isolierten Stromaten.

zeigt sich, dafs die Körperchen auch bei den Immuntieren agglutiniert werden, also noch Receptoren besitzen. Ob bei einer höheren Immunität als der untersuchten das Bindungsvermögen der vorhandenen Ricin-Receptoren der Blutkörperchen und ihre Regenerationsfähigkeit sich erschöpft, läfst sich natürlich nicht a priori entscheiden. Versuche an Ziegen, bei denen man durch Untersuchung der Milch feststellen kann, wie lange noch die Immunität wächst, werden vielleicht darüber Auskunft geben.

Bisher steht das Aufhören der Giftempfindlichkeit der Blutkörperchen im Verlaufe des Immunisierungsvorganges beim Aalblutserum vereinzelt da; denn Ehrlich[1]) und seine Schüler konnten beim Crotin und Tetanolysin ebenso wenig wie ich beim Ricin eine Resistenz der Blutkörperchen hoch-immuner Tiere beobachten.

Nachdem somit festgestellt ist, dafs die Blutkörperchen der Immuntiere ihre Agglutinierbarkeit durch Ricin bewahren, wird es nicht mehr paradox erscheinen, dafs nach einer Beobachtung von Cushny es ihm schien, als ob das Gesamtimmunblut einen höheren Grad von Agglutinationsfähigkeit zeigte als das normale. Nach Ehrlichs Hypothese dürfen wir nämlich annehmen, dafs zeitweise während der aktiven Immunisierung die Zellen mit Receptoren vollgepfropft sind, daneben enthält das Immunserum Receptoren und kann durch Ricin, wie schon oben auseinandergesetzt wurde, gefällt werden.

Ferner konnte ich mich aber überzeugen, dafs bei den Immuntieren die roten Blutkörperchen durch den Antiagglutiningehalt des Serums einen gewissen Schutz genieſsen, indem mehr Ricin nötig war, um im Gesamtimmunblute eine Blutkörperchen-Agglutination hervorzurufen, als im Gesamtnormalblute.

Um in 5 ccm einer Mischung von 5 ccm Normalblut und 95 ccm 0,92prozentiger Kochsalzlösung, in der 0,5 g citronensaures Natron gelöst war, eine maximale Agglutination zu erzielen, genügten 2 mg Ricin, während unter gleichen Verhältnissen beim Immunblute 20 mg erforderlich waren.

Diese scheinbare verminderte Empfindlichkeit war ausschliefslich durch den Antiagglutiningehalt des Serums bedingt. Denn derartig grofse Unterschiede zeigten sich stets nur bei hochimmunisierten Tieren, bei denen das Blutserum viel freies Antiricin enthielt; die vom Serum getrennten Blutkörperchen erwiesen sich, wie schon oben erwähnt, von normaler Giftempfindlichkeit.

Es haben also die freien im Serum vorhandenen Receptoren

[1]) Schlufsbetrachtungen — Nothnagels Handbuch 1901.

eine Schutzwirkung gegen das Agglutinin ausgeübt. Das ist nur so zu erklären, dafs das Agglutinin, wenn es die Wahl hat, zuerst an die freien Receptoren des Serums herantritt, d. h. eine gröfsere Affinität zu diesen den Antikörper repräsentierenden Gruppen besitzt als zu den giftempfindlichen analogen Gruppen der Blutkörperchen. Erst nach der Absättigung des Serum-Antikörpers tritt die Reaktion mit den Zellen ein. Dieses wahrscheinlich für alle Toxine zutreffende Verhalten hätte nach der Ehrlichschen Assimilationstheorie ein interessantes Gegenstück in dem Verhältnis zwischen den roten Blutkörperchen als „Speicherungscentren" und den Gewebsreceptoren bei der Aufnahme der Nahrungsstoffe. Hier nimmt Ehrlich[1]) an, dafs die Nahrungsstoffe von den Blutkörperchen an die Gewebszellen abgegeben werden „wegen der gröfseren Avidität" derselben.

Diese Auffassung von der verschieden grofsen Affinität der Serumreceptoren und der Blutkörperchenreceptoren für das Ricin findet darin eine weitere Stütze, dafs man durch nachträglichen Zusatz von Antiricin zu einer Blutgiftmischung den Prozefs der Zellenzerstörung aufhalten, also analoge Verhältnisse feststellen kann, wie sie bereits für das Tetanolysin in exakter Weise von Madsen[2]) als Heilung im Reagensglas beschrieben worden sind.

10 ccm 5prozentigen mit citronensaurem Natron behandelten Blutes werden versetzt

1. mit 1 mg Ricin — schnelle maximale Agglutination;
2. erst mit 1 ccm einer Antitoxinlösung, sodann mit 1 mg Ricin — keine Agglutination;
3. erst mit 1 mg Ricin, dann sofort nach dem Durchschütteln 1 ccm der Antiricinlösung — die Agglutination bleibt unvollständig;
4. 1 mg Ricin, nach drei Minuten 1 ccm Antitoxinlösung — die Agglutination geht weiter als bei 3., bleibt aber unvollständig.

Nr. 2 bis 4 geben, am nächsten Tage filtriert, ganz rote Filtrate, und zwar in regelrechter Intensitätsskala, indem bei 2. kein Blutfarbstoff auf dem Filter bleibt, bei 4. relativ der meiste.

Man kann somit auch nach der Mischung des Ricins mit Blut noch durch Antiricin das Gift von den Blutkörperchen ablenken.

Wenn nun auch die Receptoren der Blutzellen von den freien Receptoren sich dadurch unterscheiden, dafs ihre Affinität zum Ricin eine geringere ist, so läfst sich andererseits durch quantitative Prüfung zeigen, dafs sie in derselben Weise mit dem Ricin sich

---

[1]) Schlufsbetrachtungen in Nothnagels Handbuch 1901.

[2]) Zeitschr. f. Hygiene 32, 239—245 (1899).

verbinden. Bestimmt man die kleinste Menge Ricin, welche nötig ist, um eine Blutmenge *a* zu agglutinieren, so wird das Gemisch einer neuen Blutquantität *b* gegenüber wirkungslos, genau in der gleichen Weise, wie wenn man dem Ricin diejenige Quantität Serum-Antiagglutinin zugesetzt hätte, welche genügt, um die Blutmenge *a* dem Ricin gegenüber zu schützen.

0,17 bis 0,25 mg Ricin geben in 5 ccm verdünntem Blut gerade Agglutination, setzt man das Gemisch zu 5 ccm neuer Blutlösung, so wird diese in keiner Weise agglutiniert.

Das nähere Studium der Ricinimmunität ergiebt somit, dafs sich dieser Einzelfall der Antitoxinbildung auch in Bezug auf die Reaktionen des Giftes mit den Zellen des Immuntieres ungezwungen nach den Annahmen der Ehrlichschen Theorie deuten läfst. Dadurch dafs die Schädigung der Zellen hier direkt der Beobachtung zugänglich ist, läfst sich die Sachlage beim Ricin gut übersehen. Wir finden, dafs sowohl in den giftempfindlichen Körperzellen als im Immunserum Ricinreceptoren enthalten sind, welche in ganz analoger Weise mit dem Gift reagieren und dasselbe binden. Die freien Receptoren im Serum werden nur dadurch zu Schutzstoffen, dafs sie eine gröfsere Affinität zum Gifte besitzen als die Receptoren in den Zellen, und diese gröfsere Affinität des „Antiricins" dürfte wohl darauf beruhen, dafs die Receptoren sich im Serum in gelöstem [1]) Zustande befinden und deshalb reaktionsfähiger sind als die Zellenreceptoren. Die giftbindenden Gruppen sind hingegen in den Zellen wohl nicht in Lösung [2]). Wenigstens sprechen dafür Beobachtungen, wie die von Wassermann und Takaki [3]) über die Receptoren des Tetanusgiftes im Nervensystem, wonach normaler Gehirnbrei wohl das Tetanusgift zu binden vermag, Extrakte des Gehirns sich aber absolut wirkungslos gegen das Tetanusgift erweisen.

Über den Zusammenhang von Toxin und Agglutinin und ihre Beziehungen zum Antiricin.

Die genauere Untersuchung der Beziehungen zwischen dem Ricin und seinem bei der Immunisierung gewonnenen Reaktionsprodukt, dem Antiricin, ermöglichte schliefslich, auch der Auf-

[1]) Gelöst und nichtgelöst sind hier nur als relative Begriffe zu verstehen.

[2]) Ein weiterer Umstand, der dem Eindringen solcher toxischen Kolloide hemmend entgegenwirken dürfte, ist die relative Undurchlässigkeit des Protoplasmas für Kolloide überhaupt.

[3]) Berl. klin. Wochenschr. 1898.

klärung der Frage näher zu kommen, ob das Ricin ein einheitlicher Körper ist, oder ob man ein Toxin und ein Agglutinin unterscheiden müsse. Dieser nach mehreren Richtungen interessante Punkt ist in der Litteratur viel diskutiert worden; es ist daher nötig, zunächst auf die Beobachtungen und Schlüsse der Autoren etwas einzugehen.

Stillmark, der Entdecker der agglutinierenden Eigenschaft des Ricins, hielt das Ricin für eine einheitliche Substanz, welche sowohl die Blutkörperchen agglutiniert als auch den Tod der Tiere herbeiführt. Am meisten scheint für diese Annahme der später von Ehrlich erhobene Befund zu sprechen, dafs die gleiche Quantität Antitoxinserum genügt, um einer Ricinlösung seinen giftigen und seinen agglutinierenden Charakter zu nehmen. Ehrlich selbst geht auf die Frage der Identität nicht ein. Hingegen ist Cushny „überzeugt, dafs die tödliche Wirkung des Ricins von der Blutwirkung ganz unabhängig ist". Cushny weist zunächst darauf hin, dafs man einem Tier verhältnismäfsig grofse Mengen Ricin in eine Vene einspritzen kann, ohne an den Blutkörperchen des Tieres ein abnormes Verhalten zu bemerken. „Einen noch sichereren Beweis" für seine Anschauung erblickt Cushny darin, dafs er das Blut eines hochimmunen Kaninchens noch agglutinierbar fand. Nach den früheren Erörterungen hätte man eine derartige Unempfindlichkeit der Zellen auch gar nicht erwarten können. Die von Cushny angeführten Gründe erscheinen demnach nicht zwingend für die Annahme zweier Gifte.

Am eingehendsten hat Franz Müller die vorliegende Frage im hiesigen Institut untersucht. Sein Schlufs geht dahin, dafs das Ricin „nicht als einheitliches Gift betrachtet werden kann, da das auf den Organismus in typischer Weise wirkende Princip von der Blutwirkung in vitro getrennt werden konnte". Diese Trennung erreichte er auf zweierlei Wegen, einmal ergab sich, dafs Ricin, welches 24 Stunden mit Pepsinsalzsäure behandelt war, die gleiche Giftigkeit zeigte wie das nicht vorbehandelte Ricin: die Tiere gingen unter denselben Symptomen gleich schnell und bei entsprechendem Sektionsbefund ein, während die Wirkung auf Blutkörperchen verschwunden war. Zweitens fand Müller, dafs das Filtrat von agglutiniertem Blut noch eine wenn auch erheblich abgeschwächte Giftwirkung zeigte, aber nicht mehr agglutinierte. Diese Beobachtungen Müllers bedeuten einen erheblichen Fortschritt. Obgleich sich zeigen wird, dafs seine Resultate noch nicht eine definitive Klärung des komplizierten Problems ermöglichen,

so liefsen sich doch an die Befunde Müllers gut neue Beobachtungen anknüpfen.

Abweichend ist allerdings der Standpunkt, den Kobert den Beobachtungen Müllers gegenüber in jüngster Zeit eingenommen hat. „Daraus, dafs", schreibt Kobert[1]), „bei derartigen Versuchen (Versuche mit Pepsinsalzsäure) die Giftwirkung unserer Substanzen auf Blut rascher abnimmt als die auf gewisse andere empfindliche Gewebe des Tierkörpers, schliefsen zu wollen, dafs unsere Substanzen Gemische seien von einem Blutgifte und einem anderen Gifte (wie dies von einer anderen Seite thatsächlich behauptet worden ist), wäre natürlich ganz unrichtig und bedarf keiner speciellen Widerlegung."

Zunächt sei über Versuche berichtet, in denen ich untersuchte, ob Ricin, das mit verhältnismäfsig grofsen Blutmengen längere Zeit bei Brütschranktemperatur in Berührung war, noch seine volle Giftigkeit im Tierversuch bewahrt hat.

Versuch: Einem Kaninchen wird aus der Carotis Blut entnommen, dasselbe läuft in einige Kubikcentimeter Kochsalzlösung, in der citronensaures Natron gelöst ist.

Es werden gemischt:

A. 20 ccm Blut und 1 mg Ricin.
B. 20 ccm Blut und 0,5 mg Ricin.
C. 8 ccm Blut und 0,5 mg Ricin.

A. bis C. kommen fünf Stunden in den Brütschrank.

A. wird einem Kaninchen von 1370 g injiziert, dasselbe erhält pro Kilogramm 0,73 mg Ricin — die einfach tödliche Dosis beträgt etwa 0,5 mg — der Tod erfolgt nach $48^1/_2$ Stunden, der Sektionsbefund ist verdächtig, aber nicht völlig sicher identisch mit dem typischen Ricinbefund. Das Endgewicht beträgt 1185 g.

B. wird einem Kaninchen von 1120 g injiziert, also pro Kilogramm 0,45 mg: das Tier stirbt zwischen 78 und 87 Stunden, der Darmbefund ist nicht für Ricin typisch. Endgewicht 1010 g.

C. wird einem Kaninchen von 1517 g injiziert, also pro Kilogramm 0,33 mg, bei dem Tier werden nach 43 Stunden furchtbare Krämpfe beobachtet, nach 63 Stunden wird es tot gefunden. Der Sektionsbefund ist nicht ganz typisch. Endgewicht 1365 g.

Diese Versuchsreihe zeigt, dafs das Ricin trotz längerer Einwirkung von Blut in einer Mischung, in der alles vorhandene Agglutinin völlig vom Blute gebunden sein mufste, quantitativ dieselbe Giftigkeit bewahrt hat. Allerdings mufs es zweifelhaft sein, ob das einwirkende Gift noch das gänzlich unveränderte Ricin dar-

[1]) Sitzungsberichte der naturforschenden Gesellschaft zu Rostock (Anhang z. Arch. d. Ver. d. Freunde d. Naturg. in Mecklenb.) 1900, Nr. 3, 25. Mai.

stellt, da die Sektionsbefunde nicht ganz typisch ausfielen. Müller fand bei Blutversuchen, in denen er den durch Ricin entstandenen Niederschlag abfiltrierte, das Filtrat noch giftig, aber die Giftigkeit war erheblich abgeschwächt. Ich glaubte auf diese Müllerschen Versuche keinen ausschlaggebenden Wert legen zu sollen, weil das Gift ähnlich wie das Hämoglobin bei der Agglutination mit niedergerissen sein konnte. Deshalb habe ich ungerinnbares Blut und zwar im grofsen Überschusse angewandt und nicht filtriert.

Wenn nun ein einheitliches Gift vorlag, so konnte man sich denken, dafs die Receptoren der Blutkörperchen gleichsam als Antitoxin fungieren und bei ihrer Agglutinierung das Gift in eine feste Bindung überführen würden. Dieses Blutgiftgemisch hätte dann wie ein Antitoxin-Toxingemisch bei der Injektion in den Tierkörper unwirksam bleiben müssen. Ein solcher Versuch würde ein Analogon darstellen zu der Entgiftung von Tetanusgift mittels Gehirnbrei, welche Mischung nach Wassermann bei der Injektion in den Tierkörper unwirksam bleibt. Die Versuche fielen aber wie diejenigen Müllers im entgegengesetzten Sinne aus, ohne dafs die gleichen Einwände möglich wären wie bei der Anwendung von Blutfiltrat. Das Blutgiftgemisch erwies sich von quantitativ gleicher Giftigkeit. Dies Resultat scheint auf den ersten Blick für die Möglichkeit einer völligen Trennung von Agglutinin und Toxin zu sprechen. Doch möchte ich diesen Schlufs noch nicht ziehen. Denn es wäre denkbar, dafs das einheitliche Gift an die Blutzellen gebunden wäre, in gebundener Form zu den lebenswichtigen Gewebszellen gelangt und von diesen dem Blute entrissen wird. Wir haben ja früher auseinandergesetzt, dafs die Affinität des Agglutinins zu den verschiedenen bindenden Substanzen des Tierkörpers eine verschieden grofse ist. Ebenso wie das Serumantiagglutinin das Gift der Blutzelle entreifsen kann, steht nichts im Wege, anzunehmen, dafs die Organzelle ihrerseits das Gift der Blutzelle wegnehmen kann. Zellen der gleichen Affinität gegenüber, bei neuem Zusatz von Blut, ist die agglutinierende Wirkung allerdings erschöpft. Ähnliche Erfahrungen liegen auch bei anderen Giften vor, indem in manchen Fällen Mischung mit dem Brei sicher giftempfindlicher Organe einen Schutz nicht gewährt.

Einen besseren Einblick gewährten Versuche mit Pepsinsalzsäure. Dabei war es notwendig, das Bindungsvermögen des so mit Pepsin behandelten Giftes für die Antikörper mit zu berücksichtigen. Zunächst seien die Versuchsprotokolle wiedergegeben.

0,35 g Merck'sches Ricin werden fünf Tage im Brütschrank mit hochwirksamer Pepsinsalzsäure behandelt, dann wird neutralisiert, mit Ammonsulfat eine Salzsättigung von 60 Proz. hergestellt, der entstehende Niederschlag mit entsprechender Salzlösung gewaschen und schliefslich in 90 ccm einer 10prozentigen Kochsalzlösung gelöst.

Diese Lösung müfste, wenn kein Gift verloren gegangen ist, in 1 ccm 3,9 mg Ricin enthalten, die kleinste, schnell tödliche Dosis müfste 0,13 ccm pro Kilogramm Kaninchen betragen, da sie beim Ausgangsmaterial 0,5 mg beträgt, die kleinste agglutinierende etwa 0,06 bis 0,07 ccm, da sie beim Ausgangsmaterial etwa 0,2 mg beträgt.

Der Versuch ergab aber völlig andere Verhältnisse, indem erst 5 ccm der Lösung merklich agglutinierten, während die Tierversuche folgende Resultate ergaben.

1. Kaninchen von 1250 g erhält am 6. V. mittags 1 ccm oder 0,8 ccm pro Kilogramm.
   7. V. 1172 g, 8. V. 1002 g. Das Tier wird tot gefunden, die Sektion ergiebt einen ganz typischen Ricinbefund.
2. Kaninchen von 1065 g erhält am 7. V. vormittags 0,4 ccm oder 0,38 ccm pro Kilogramm.
   8. V. 1002 g. Das Tier stirbt am 8. V. abends nach stundenlangen Krämpfen. Das Endgewicht beträgt 923 g, der Sektionsbefund ist ganz typisch.
3. Kaninchen von 1177 g erhält am 8. V. 0,2 ccm oder 0,17 ccm pro Kilogramm.
   9. V. 1045 g, 10. V. 1024 g, das Tier wird tot gefunden, der Sektionsbefund ist ganz typisch.
4. Kaninchen von 1264 g erhält am 9. V. vormittags 0,1 ccm oder 0,08 ccm pro Kilogramm.
   10. V. 1154 g, 12 V. 1064 g, 14 V. 955 g, 15 V. 973 g, das Tier wird tot gefunden, der Sektionsbefund ist nicht typisch.

Die eben noch schnell tödliche Dosis liegt also nicht über 0,17 ccm, entspricht also dem Resultat (0,13 ccm), welches zu erwarten wäre, wenn alles Gift noch vorhanden ist: im Gegensatz zur agglutinierenden hat also die Giftwirkung nicht abgenommen.

Nunmehr wurde untersucht, wieviel Immunserum nötig war, um unser Gift zu neutralisieren.

Es wurde ein Antitoxin benutzt, von dem genau 1 ccm genügte, um 1 mg nicht vorbehandeltes Ricin (entsprechend 0,26 ccm der Pepsinricinlösung) gänzlich zu neutralisieren.

Neutralisationsgrenze für das Agglutinin.

5 ccm Pepsinricin und 1 ccm Antitoxin — keine Agglutination.
6 ccm Pepsinricin und 1 ccm Antitoxin — deutliche Agglutination.

Neutralisationsgrenze für das Toxin.

Es werden gemischt 1 ccm Antitoxin mit:

0,5 ccm Pepsinricin	keine Gewichtsabnahme der Versuchstiere.
1 „ „	
2 „ „	
3 „ „	
4 „ „	
5 „ „	
6 „ „	18 Proz. Abnahme.
7 „ „	19 „ „
8 „ „	19 „ „

Es ist demnach 1 ccm Antitoxin nötig, um die Spuren Agglutinin, welche in 5 ccm Pepsinricin vorhanden sind, zu neutralisieren, d. h. eine Agglutinationswirkung, wie sie von einigen Zehnteln Milligramm Ricin hervorgerufen wird: dagegen wird durch 1 ccm Antitoxin auch die toxische Wirkung von 5 ccm Pepsinricin neutralisiert, also die toxische Wirkung von mindestens 15 mg Ricin.

Auch die Tiere, die über die Grenze der vollen Neutralisation hinaus enorme Giftüberschüsse injiziert erhielten, zeigten nur starke Gewichtsabnahme, starben aber nicht. Das ist eine Beobachtung, wie sie bei derartigen Neutralisationsversuchen häufig gemacht wird, dafs nämlich der Giftüberschufs nicht die volle toxische Wirkung mehr entfaltet. Knorr fand beim Tetanus, dafs ein grofser Giftüberschufs, der einem neutralen Toxin-Antitoxingemisch zugesetzt wird, physiologisch nur noch wie eine geringe Giftmenge wirkt. „So können", schreibt Dieudonné[1]), „100000 Gifteinheiten, die einer konzentrierten neutralen Mischung im Überschufs zugesetzt sind, möglicherweise nur ebenso wirken wie 20 Gifteinheiten, die frei und für sich (d. h. nicht in einem neutralen Gemisch) zur Anwendung gelangen. Zur Aufhebung der krankmachenden Wirkung dieser 100000 Gifteinheiten sind aber nicht, wie nach der physiologischen Wirkung anzunehmen, 20 Einheiten Antitoxin nötig, sondern annähernd 100000 Einheiten." Man mufs deshalb als Neutralisationspunkt die Grenze vollkommener Neutralisation wählen.

Die direkten Resultate der ganzen Versuchsreihe sind demnach folgende:

1. Das Ricin bleibt bei der Behandlung mit Pepsinsalzsäure unabgeschwächt giftig, der Sektionsbefund typisch, während die agglutinierende Wirkung sehr stark abgenommen hat.

[1]) Schutzimpfung mit Serumtheraphie, 2. Auflage, 1900, S. 43.

Vorher genügte eine halbe letale Dosis zur deutlichen Agglutination, jetzt sind 30 letale Dosen notwendig.

Dieser Befund bildet eine Bestätigung der Angaben Müllers, nur dafs sich trotz intensiverer Einwirkung der Pepsinsalzsäure immer noch etwas Agglutinin fand. Das liegt wohl daran, dafs ich durch die Antitoxinkontrolle vor Verwechslung mit einer nichtspecifischen Agglutination geschützt war und daher auch die Agglutinationswirkung gröfserer Flüssigkeitsvolumina untersuchen konnte.

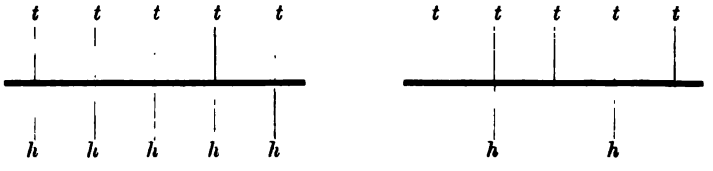
2. Das Ricin bleibt bei 60 Proz. Ammonsulfatsättigung aussalzbar.
3. Beide Wirkungen lassen sich durch Immunserum aufheben. 1 ccm Immunserum, welches zwei letale Dosen Ricin neutralisiert, hebt die Giftwirkung von 30 letalen Dosen Pepsinricin vollständig auf.
4. Die gleiche Quantität Immunserum, welche genügt, um die geringe noch vorhandene Agglutininwirkung zu neutralisieren, ist auch ausreichend, um den unveränderten Giftgehalt völlig aufzuheben.
5. Der Parallelismus zwischen der antiagglutinischen und der antitoxischen Immunserumwirkung ist also trotz der Verschiebung zwischen Agglutinin- und Giftwirkung erhalten geblieben: trotz der verschiedenen Intensität der beiden Wirkungen ist genau wie bei dem ursprünglichen Ricin bei dem Zusatz, bei dem die eine neutralisiert wird, auch die andere neutralisiert.

Diese Sätze, welche möglichst ohne jede Deutung die direkte Wiedergabe der Beobachtungen darstellen, zeigen, wie auch beim Ricin durch das Studium der Antitoxinbindung eine gröfsere Komplikation des Ricingiftes aufgedeckt wird. Wem bekannt ist, eine wie enorme experimentelle Arbeit bei der Diphtherie nötig war, um einen Überblick über die verschiedenen Modifikationen des Giftes zu schaffen, der wird einsehen, dafs eine ähnlich detaillierte Kenntnis des Ricingiftes nur durch eine weit gröfsere Versuchsreihe erzielt werden könnte. Immerhin lassen sich schon jetzt einige Folgerungen mit voller Sicherheit aus den bisherigen Befunden ableiten.

Zunächst wollen wir gänzlich von der Identitätsfrage absehen und die toxische Wirkung für sich betrachten. Wir konnten nachweisen, dafs keine Abnahme der Giftigkeit und dennoch eine Abnahme des Antitoxinbindungsvermögens der Giftlösung bei der

Pepsinbehandlung stattgefunden hat. Machen wir die Ehrlichsche Annahme, dafs das Toxin aus toxophoren und bindenden, haptophoren Gruppen besteht, so würden wir unser Resultat so ausdrücken können: es sind durch die Pepsinsalzsäurebehandlung in den Toxinkomplexen keine toxophoren, wohl aber zum Teil die haptophoren Gruppen angegriffen worden.

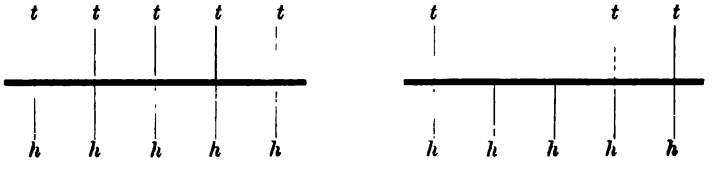
Hält man sich an Ehrlichs Art der Darstellung, so läfst sich dieses Verhalten etwa folgendermafsen wiedergeben, wobei die Qualität der reagierenden Gruppen durch Buchstaben bezeichnet wird und zwar durch a die agglutinophore Gruppe, durch t die toxophore, durch h die haptophore Gruppe des Toxins, durch h_1, die haptophoren Gruppen des Agglutinins.



Vor Nach

der Behandlung mit Pepsinsalzsäure.

Umgekehrt beobachtete Ehrlich[1]) bei dem Diphtherietoxin, dafs dasselbe beim Stehen weniger giftig wurde, aber das gleiche Bindungsvermögen behielt. In gleicher Weise schematisch ausgedrückt, gelangen wir zu folgendem Bilde:

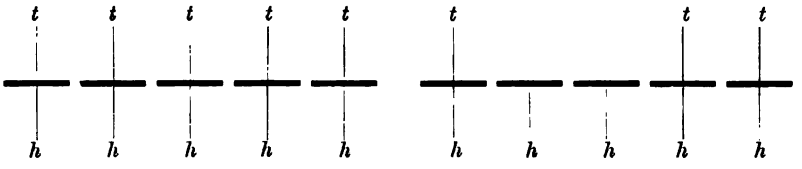


Frisches Diphtheriegift Altes Diphtheriegift.

Bei der Diphtherie können wir nun leicht dieses allgemeine Schema in eine Reihe einzelner Toxinschemata umwandeln. Nehmen wir an, dafs in dem frischen Diphtherietoxin fünf haptophore fünf toxophoren Gruppen gegenüberstanden, später drei toxophore fünf haptophoren. Dann können wir ohne weiteres im Anfang fünf Einzel-Vollkomplexe und nachher drei solche und zwei Toxoide, die nur aus haptophoren Gruppen bestehen, annehmen.

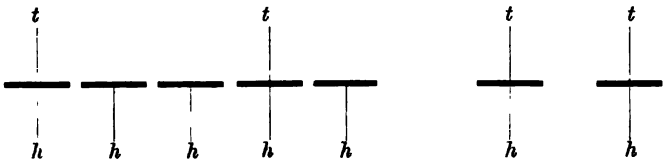
---

[1]) Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums, Jena 1897.



Toxinkomplexe. Toxoidkomplexe.

In unserem Falle läfst sich diese Auflösung nur durchführen, wenn wir vor der Behandlung freie haptophore Gruppen, d. h. Toxoide annehmen. Sonst würden wir zur Annahme freier toxophorer und doch noch wirkender Gruppen gelangen, eine Annahme, welche ja von vornherein ausgeschlossen ist. Somit kommen wir, wenn wir unseren Befund nach den von Ehrlich entwickelten Vorstellungen deuten sollen, zu folgendem Schema:



Vor Nach

Behandlung mit Pepsinsalzsäure.

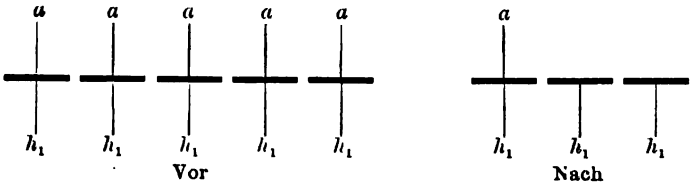
Danach würden die aufgefundenen Thatsachen sich folgendermafsen formulieren lassen:

1. Es giebt Ricintoxoide.
2. Durch Pepsinsalzsäurebehandlung kann man die Toxoide entfernen.

Namentlich auf den letzten Punkt möchte ich besonders hinweisen, weil die Trennung des Toxins von Toxoiden vielleicht einiges Interesse beanspruchen dürfte. Da wir mit der Pepsinsalzsäurebehandlung die fraktionierte Aussalzung kombiniert haben, so ist es nicht ausgeschlossen, dafs die Toxoide bei der Verdauung in Spaltungsprodukte übergegangen sind, die durch die Aussalzung vom Toxin getrennt wurden. Diese Frage bedarf besonderer Bearbeitung.

Ferner mufs die Affinität der Toxoide zum Antitoxin als eine gleiche oder gröfsere als die des Toxins angenommen werden, wie das Ehrlich auch für gewisse Diphtherie-Toxoide gefunden hat. Sonst wäre nicht zu verstehen, warum sie bei der Neutralisation des Gemisches mit abgesättigt werden; wäre ihre Affinität kleiner, so würden sie ja bei der Titration des Toxins, bei der die toxische Wirkung als Indikator dient, vernachlässigt werden.

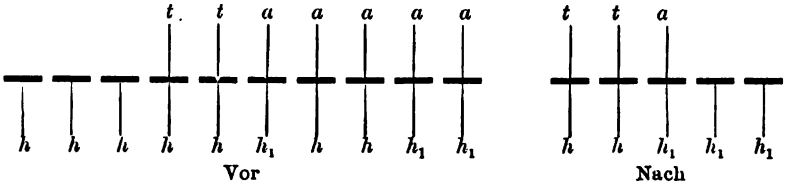
Führen wir nun eine ebenso gesonderte Betrachtung für das Agglutinin durch, so ergiebt sich, die agglutinophoren wie die haptophoren Gruppen haben stark abgenommen, die agglutinophoren aber noch mehr als die haptophoren:



Vor Nach

der Behandlung mit Pepsinsalzsäure.

Vereinigen wir die definitiven Schemata, so erhalten wir folgendes Bild:



Vor Nach

der Behandlung mit Pepsinsalzsäure.

Was lehren nun diese Schemata, und wie lassen sie sich vereinfachen?

Einmal ist sicher, dafs die toxophoren und agglutinophoren Gruppen verschieden sein müssen: denn diese haben stark abgenommen, jene nicht.

Weit schwieriger ist die Frage zu beantworten, ob die zugehörigen haptophoren Gruppen identisch sind oder nicht.

Gegen die Annahme einer einheitlichen haptophoren Gruppe sprechen am meisten unsere oben mitgeteilten Versuche, wonach das an die roten Blutkörperchen fixierte, nicht mehr agglutinierende Ricin noch seine volle toxische Wirkung hat. Jedoch erscheint uns dieser Schlufs nicht zwingend, weil es durchaus möglich ist, dafs das Centralnervensystem infolge seiner grofsen Affinität zu dem Gift dasselbe den Blutkörperchen entreifst.

Auf ganz analoge Verhältnisse stiefsen Neisser und Wechsberg[1]) bei der Untersuchung der Frage, ob das Hämolysin und Leukocidin der Staphylokokken dieselben haptophoren Gruppen haben. Alles sprach für die Identität: während jedoch rote Blut-

[1]) Zeitschr. f. Hygiene 36 (1901).

körperchen die beiden Gifte banden, wurde durch weifse Blutkörperchen nur das Leukocidin gebunden. Die Verfasser gelangen daher zu dem Resultat, dafs zwei haptophore Gruppen vorhanden sein dürften. Es mag der Hinweis darauf gestattet sein, dafs vielleicht die Annahme einer verschieden grofsen Affinität des Giftes zu den roten und weifsen Blutzellen es ermöglicht, die widersprechenden Befunde ganz wie in unserem Falle zu deuten. Wenn wir für die roten Blutkörperchen die gröfsere Affinität annehmen, so werden die gebundenen haptophoren Gruppen nicht mehr an die weifsen Blutkörperchen herantreten, also eine Leukocidinwirkung nicht mehr zu stande bringen können; umgekehrt werden die roten Blutzellen das gebundene Staphylotoxin den weifsen Blutkörperchen entreifsen, es wird also das Gift noch als Hämolysin funktionieren können, während natürlich Receptoren von weifsen Blutkörperchen, also solche gleicher Affinität, das an die Leukocyten gebundene Gift diesen nicht werden entreifsen können.

Der einzige Einwand gegen die Annahme identischer, haptophorer Gruppen erweist sich somit in unserem Falle als nicht unbedingt beweiskräftig. Alle anderen Befunde sprechen, wie in dem Falle von Neisser und Wechsberg, auch für die agglutinophoren und toxophoren Gruppen des Ricins für die Annahme einer gemeinsamen haptophoren Gruppe.

Zunächst stimmt damit überein, dafs man die Antikörper bisher nicht voneinander trennen kann. Wir haben gesehen, sie gehen in dieselbe Serumfraktion, werden durch die gleichen Eingriffe zerstört oder widerstehen ihnen. Allerdings können auch diese Beobachtungen noch nicht als ausschlaggebend gelten, da ja die beiden Antikörper und dementsprechend die haptophoren Gruppen der Gifte in vielen Eigenschaften übereinstimmen, aber doch verschieden sein könnten.

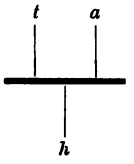
Beweisender für die Annahme einer haptophoren Gruppe ist schon der Befund Ehrlichs[1]), dafs genau die gleiche Quantität Immunserum nötig ist, um die beiden Wirkungen des Ricins zu neutralisieren. Es wäre bereits auffallend, wenn ein derartiger Parallelismus bei verschiedenen Substanzen vorhanden wäre. Diese Verschiedenheit wird aber dadurch unmöglich, dafs nach der Behandlung mit Pepsinsalzsäure trotz der grofsen Verschiebung nach anderen Richtungen dieser Parallelismus erhalten geblieben ist.

Im Gegensatz zu dem so ausgeprägten Parallelismus beim

[1]) Fortschritte der Medizin 1897.

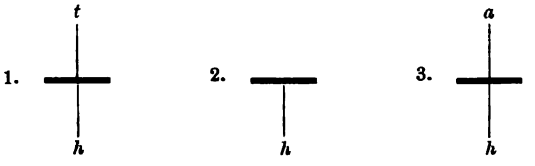
Ricin konnte Ehrlich[1]) beim Tetanolysin und Tetanospasmin, die zwei völlig verschiedene Gifte darstellen, von einem derartigen Parallelismus der Antitoxine nichts bemerken.

Wir halten somit die Annahme einer haptophoren Gruppe für wahrscheinlicher. Wie lassen sich nun von dieser Annahme aus die Erscheinungen deuten? Die eigentlichen Ricinkomplexe hätte man sich danach mit einer toxophoren, einer agglutinophoren und einer haptophoren Gruppe ausgestattet zu denken:



Ricinkomplexe.

Alle Befunde erklären sich dann durch die Annahme von Toxoiden. Von solchen Toxoiden sind dreierlei theoretisch möglich:

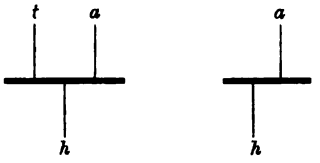


Wir brauchen dann das Merckscbe Ricin, unser Ausgangsmaterial, uns nur als ein Gemenge von Ricin-Toxinkomplexen und Ricintoxoiden vorzustellen, um alle Erscheinungen erklären zu können. Die Annahme von Toxoiden im Merckschen Ricin hat sehr viel Wahrscheinlichkeit für sich, weil, wie die Firma uns freundlichst mitteilte, die Wirksamkeit des frisch hergestellten Giftes bei der Aufbewahrung allmählich abnimmt. Das von uns bezogene Gift war ein altes und blieb während unserer Studien konstant. Ganz so ist es vom Diphtheriegift bekannt, dafs bei seiner Aufbewahrung Toxoide entstehen, dafs die Toxoidbildung aber nach einiger Zeit ihr Ende erreicht. Um unsere Annahme, dafs die Abnahme der Giftigkeit bei der Aufbewahrung des Ricins auf der Entstehung von Toxoiden beruht, einwandsfrei beweisen zu können, fehlt noch der Nachweis des gleichen Bindungsvermögens im frischen und im alten Ricin. Dafs aber in unserem Ausgangsmaterial Toxoide vorhanden waren, geht schon aus dem Ausfall des Pepsinversuches hervor.

---

[1]) Mitgeteilt bei Madsen, Über Tetanolysin, Zeitschr. f. Hygiene 32 (1899).

Wir stellen uns somit unser Ausgangsmaterial als ein Gemisch von Ricinkomplexen und Toxoiden vom Typus 3, d. h. Toxoiden mit einer haptophoren und einer agglutinophoren Gruppe vor:



Durch die Pepsinsalzsäure werden diese Toxoide beseitigt. Daneben könnten Toxoide vom Typus 1, d. h. solche mit der haptophoren und der toxophoren Gruppe entstehen, indem aus den Vollkomplexen die agglutinophoren Gruppen abgespalten werden. Diese Annahme ist nicht wesentlich.

Nach dieser Deutung ist es vollkommen verständlich, dafs die toxische und die agglutinierende Wirkung nach wie vor der Pepsinsalzsäurebehandlung durch die gleiche Quantität Immunserum neutralisiert werden; ebenso versteht man, dafs die Giftigkeit quantitativ gleich geblieben ist, die Agglutinationswirkung und das Bindungsvermögen aber abgenommen hat.

Unsere Deutung der Befunde, welche durch spätere Beobachtungen wohl modifiziert werden könnte, ermöglicht somit eine befriedigende Gruppierung des vorliegenden Thatsachenmaterials und erklärt in relativ einfacher Weise alle bisherigen Beobachtungen.

Anm. bei der Korrektur: Wie schon oben hervorgehoben, sei hier nochmals betont, dafs die Existenz zweier haptophorer Gruppen durch die vorliegenden Beobachtungen keineswegs ausgeschlossen erscheint. Aus der neuesten, sechsten Mitteilung von Ehrlich und Morgenroth geht hervor, eine wie grofse Zahl ähnlicher und doch verschiedener Immunkörper und Receptoren nebeneinander bestehen können. Zur Erklärung der bisherigen Befunde beim Ricin reicht jedoch die Annahme einer haptophoren Gruppe aus. Doch ist es möglich, dafs auch beim Ricin wie bei anderen Immunitätsfragen die weitere Forschung von dem scheinbar einfachen zu dem thatsächlich komplizierten Sachverhalt führt.

Kürzere Mitteilungen.

1. Über die Einwirkung der Serumglobuline auf die Gerinnung des Muskelplasmas.

Von K. Spiro.

Vor einigen Monaten haben E. Fuld und ich [1]) zeigen können, dafs das Serumglobulin, dessen Nichteinheitlichkeit zwar wiederholt behauptet, aber auch ebenso oft bestritten, jedenfalls nicht definitiv nachgewiesen war, sich durch Salzfällung, und zwar ebensowohl mit Kaliumacetat wie mit Ammonsulfat, in zwei Fraktionen zerlegen läfst, für die wir die Namen „Euglobulin“ und „Pseudoglobulin“ in Vorschlag brachten.

Die Differenz der beiden Fraktionen liefs sich aufser durch ihre Fällungsgrenzen auch durch andersartige Versuche demonstrieren, indem Fuld und ich zeigen konnten, dafs dem Euglobulin eine labende, dem Pseudoglobulin eine labhemmende Wirkung zukommt, und wir wiesen schon damals auf Grund von Litteraturangaben darauf hin, dafs unser Pseudoglobulin der Träger mancher „Antikörper“ des Serums ist.

Gelegentlich von Versuchen, welche Herr Dr. H. Przibram aus Wien im hiesigen Institut von ganz anderen Gesichtspunkten aus über die Gerinnung der Muskeleiweifsstoffe gemacht hat, und über die er selbst ausführlicher berichten wird, hatte derselbe die Güte, auf meine Bitte auch die Einwirkung der beiden Globuline auf die Muskelgerinnung zu untersuchen. Das Resultat derselben erhellt aus der folgenden kleinen Tabelle:

Schleie (Cyprinus Tinca), die Muskeln in der gewöhnlichen Weise zerkleinert, mit Quarzsand in physiologischer Kochsalzlösung verrieben, koliert und filtriert; das Filtrat, welches Myogen, Myosin und Myoproteid enthält, ist etwas trübe, opalescent gelblich.

Das am 9. II. 1901 gewonnene Plasma wurde noch am selben Tage $5^h\ 15'$ mit den beistehenden Flüssigkeiten versetzt.

---

[1]) Zeitschrift für physiol. Chemie 31, 139.

Zu gleichen Teilen mit	Sofort nach Zusatz	6^h 05	11. II. 10^h Vorm.	4^h Nm.	Filtrat
1. Physiologischer Kochsalzlösung	keine Veränderung	unverändert	unverändert	unverändert	—
2. Euglobulin (auch auf Zusatz von wenigen Tropfen)	Fällung		dicker Satz	unverändert[1])	milchige Flüssigkeit
3. Pseudoglobulin	trüb, keine Veränderung		undurchsichtig, trüb, kein Niederschlag	enthält einzelne Flocken[1])	—
4. 10 prozentigem salicylsauren Natron	Fällung		dicker Satz	unverändert	klar, rötlich
5. Konz. Kaliacetatlösung	Fällung		dicker Satz	unverändert	klar, wasserhell
6. 10 prozentigem Rhodankalium	keine Fällung		unverändert	unverändert	—
7. 10 prozentigem Chlorcalcium	keine Fällung		undurchsichtig, trüb, kein Niederschlag	Gipsniederschlag	—
8. 5 prozentigem koffeinbenzoesauren Natron	keine Fällung		undurchsichtig, trüb, kein Niederschlag	unverändert	—

Das Filtrat der Euglobulin-Fällung wurde einer fraktionierten Hitzekoagulation unterzogen: dabei ergab sich die Anwesenheit eines zwischen 37 und 44° koagulierenden Körpers, des Myogenfibrins, und eines zwischen 48 und 53,5° opalisierenden, zwischen 54 und 58° koagulierenden Körpers, des Myogens; das Myosin war also offenbar durch das Euglobulin zum gröfsten Teile gefällt, während salicylsaures Natron und Kaliacetat ein bis auf Spuren von Myogen fast eiweifsfreies Fitrat lieferten.

Im Gegensatz zum Euglobulin zeigt das Pseudoglobulin nicht nur keine fällende Wirkung, sondern es vermag sogar die fällende Wirkung von zu gleichem Teile zugesetztem salicylsauren Natron oder Kaliacetat aufzuheben. Da salicylsaures Natron das Myogen sehr stark zu fällen pflegt, kann die Verschiedenheit nicht auf einer vorangegangenen spontanen Koagulation des Myosins beruhen.

Orientierende Versuche an anderen Plasma-Arten gaben ähnliche Resultate. Ich teile diese Beobachtungen mit, weil es vielleicht von Interesse ist, dafs durch fraktionierte Salzfällung im Serum, das, wie O. v. Fürth gezeigt hat, auf Muskelplasma gerinnungshemmend wirkt, noch ein zweiter Stoff nachgewiesen werden kann, der als gerinnungserregend zu bezeichnen ist.

Auf diese Beobachtungen soll bei geeigneter Gelegenheit zurückgegriffen werden.

Strafsburg i. E., Mai 1901.

[1]) Hält sich weiterhin bis zum Abbruch des Versuches unverändert.

2. Über die Verwendbarkeit der Schilfschläuche zur Dialyse.

Von cand. med. **P. Philippson.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

Auf eine Anregung von Kroutizine hin hat Metschnikoff[1]) und später sein Schüler Podbelsky[2]) Schilfschläuche — d. h. die zusammenhängende Membran, welche die Höhlung der Internodien von Phragmitis communis auskleidet — zur Trennung der Bakterien von ihren Stoffwechselprodukten verwandt. Nach einer kurzen Bemerkung von Metschnikoff läfst diese Membran Salze, Albumosen, Peptone und Alkaloide durchtreten, während sie Bakterien zurückhält. Podbelsky beobachtete überdies, dafs bei Dialyse von Blutserum durch diese Membran das Aufsenwasser Xanthoproteinreaktion zeigt, was er auf den Durchtritt von Eiweifs bezieht.

H. Conradi[3]) fand einerseits die Durchlässigkeit der Schilfschläuche für diffusible Stoffe, andererseits deren Impermeabilität für Bakterien bestätigt.

Während sich die Verwendung der Schilfschläuche für bakteriologische Zwecke ausbreitet, sind sie für chemische und physiologische Arbeiten noch kaum in Gebrauch gezogen worden. Da Vorversuche lehrten, dafs dieses Material für Dialysierversuche gegenüber tierischen Membranen und dem Pergamentpapier gewisse Vorzüge besitzt, sind sie im hiesigen Laboratorium mehrfach mit Nutzen in Gebrauch gezogen worden[4]), und es war wünschenswert, Näheres über die Verwendbarkeit dieses Materials zu ermitteln.

Bei Podbelsky und Conradi findet sich die Beschreibung der Herstellung der Schläuche: Möglichst dicke Schilfrohre werden in ihre Segmente geteilt und diese eine Stunde in kochendes Wasser gelegt. An einem Segmentende wird hierauf durch sorgfältiges Abschneiden eine Strecke der innersten Membran freigelegt und der kleine Membrancylinder mit einem Seidenfaden zugebunden. Dieses zugebundene Ende wird auf einem abgerundeten Glasstab durch das ganze Segment hindurchgeschoben. Die Membran löst sich dabei von der Schilfwand und befindet sich schliefslich in ganzer Ausdehnung auf dem Glasstab. Man kann so Schläuche von 15 cm Länge und 8 bis 10 ccm Fassungsraum erhalten.

[1]) Annal. de l'Instit. Pasteur **1**, 326 (1887).

[2]) Daselbst **12**, 433 (1898).

[3]) Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskr. **34**, 287 (1900).

[4]) Vgl. K. Glaessner, diese Beiträge **1**, 14.

Die mikroskopische Untersuchung lehrt, dafs die Membran der Schläuche aus mehreren Schichten ohne Intercellularräume aneinander gefügter, gestreckter Parenchymzellen besteht, welche kein Protoplasma und keine Stärke enthalten. Die Dicke der Wand beträgt nach annähernder Messung etwa 0,08 mm. Die Schläuche bestehen fast aus reiner Cellulose, wie aus den mikrochemischen Reaktionen und ihrer Elementaranalyse hervorgeht.

Die Analyse einer Anzahl getrockneter Schläuche ergab: C = 45,00 Proz., H = 5,91 Proz., N = 1,443 Proz., Asche = 3,153 Proz., während sich für Cellulose C = 44,44 Proz., H = 6,17 Proz. berechnet. Der niedrige N-Gehalt ist wohl auf geringe Reste von Proteinstoffen zu beziehen. Wenigstens geben die Schläuche eine schwache Millonsche und eine deutliche Xanthoproteinreaktion. Im wässerigen Auszug der Schläuche liefsen sich Ca, Cl und SO_4 nachweisen.

Bei Ausführung der Diffusionsversuche wurde so vorgegangen, dafs die Schläuche über das mit einer Rille versehene Ende eines Glasröhrchens gezogen und fest an dasselbe angebunden wurden. Stiegen beim anhaltenden Aufblasen des Schlauches unter Wasser keine Luftblasen auf, so wurde dies als Beweis für die Brauchbarkeit des betreffenden Schilfschlauches angesehen. Über die Glasröhre wurde ein Kork geschoben und der mit der zu untersuchenden Lösung gefüllte Schlauch in ein die betreffende Aufsenflüssigkeit enthaltendes Reagensglas so tief hineingesenkt, bis Aufsen- und Innenflüssigkeit gleich hoch standen. Zur Untersuchung gelangten:

A. Anorganische Stoffe:

$NaCl$, KBr, KJ, KFl, KNO_3, $KClO_3$, $KMnO_4$, CO_2, K_2CO_3, KH_2PO_4, $K_4P_2O_7$, K_2S, K_2SO_3, $KHSO_4$, $K_2Cr_2O_7$, $CaCl_2$, $BaCl_2$, $Sr(NO_3)_2$, $MgCl_2$, Alaun, Chromalaun, $ZnCl_2$, kolloidales Eisenoxyd, $NiSO_4$, $CuCl_2$, $HgCl_2$, $HgNO_3$, $CdCl_2$, $AgNO_3$, $PtCl_4$, Na_3AsO_4, HPO_3, $NaPO_3$, Wolframsäure, Phosphorwolframsäure, molybdänsaures Ammon, Wasserglas, H_2O_2, Bromwasser.

In allen diesen Fällen erwies sich die Wand der Schilfschläuche als durchlässig, mit Ausnahme der Versuche mit kolloidalem Eisenoxyd, wo die Diffusion gänzlich ausblieb, und mit käuflichem Wasserglas, wo in der ersten Zeit ein kleiner Teil der Silikate ins Aufsenwasser übertrat, später aber nichts mehr, so dafs hier eine Trennung von verschiedenen Silikaten ermöglicht scheint.

Bemerkenswert ist die Diffusibilität so komplexer Säuren wie Metaphosphorsäure, Wolfram-, Molybdän-, Phosphorwolframsäure sowie der Salze der Schwermetalle. Die Dünne der Wand und die geringe chemische Veränderlichkeit der Membran gestattet selbst dem Permanganat und Silbernitrat den Durchtritt, doch stellt sich in beiden Fällen nach kurzer Zeit Färbung der Membran und zunehmende Undurchlässigkeit infolge der Abscheidung von Braunstein resp. Silber ein.

B. Organische Stoffe.

Die Membran erwies sich als durchlässig für alle geprüften Krystalloide: Chloroform, Alkohol, Acetaldehyd, Äther, Chloral, Glycerin, Glukose, Laktose, Galaktose, Furfurol, Ferrocyankalium, Ferricyankalium,

Rhodankalium, Nitroprussidkalium, Benzol, Phenol, Brenzkatechin, Salicylsäure, α-Naphtol, Phloridzin, Piperidin, Atropin, Kokain, Morphin, Strychnin, Chinin, Gallensäure, Bilirubinnatrium und auch für Erythrodextrin und Protalbumose.

Die Membranen besitzen Durchlässigkeit auch für andere als wässerige Lösungen. So diffundierte alkoholische Traubenzuckerlösung gegen Alkohol, ätherische Salicylsäurelösung gegen Äther.

Nichtdurchlässig waren die Schilfschläuche für Glykogen, für koagulable Eiweifskörper, für Heteroalbumose, Trypsin und den gerinnungshemmenden Bestandteil des Blutegelextraktes. Pepsin scheint jedoch, wenngleich nur in Spuren, durchzutreten. Unter vier einschlägigen Versuchen zeigte das Diffusat dreimal peptische Wirkung, was mit dem Befund von Chodschajeff[1]), der Pergamentschläuche für Pepsin etwas durchlässig fand, in Übereinstimmung steht.

Endlich habe ich Versuche über die Verwendbarkeit der Schläuche für die Alkalescenzbestimmung im Blut angestellt. Bekanntlich hat zuerst W. Kühne[2]) zur Prüfung der Blutalkalescenz eigentümliche Dialysatoren aus Pergamentpapier empfohlen; später hat A. Gürber[3]) Pergamentschläuche zur quantitativen Bestimmung des diffusiblen Blutalkalis benutzt.

Um die Dialyse zu beschleunigen, wurden die mit Pferdeblutserum resp. defibriniertem Pferdeblut gefüllten Schilfschläuche innerhalb der Aufsenflüssigkeit durch eine Schüttelvorrichtung hin und her bewegt. Als Aufsenflüssigkeit wurde physiologische Kochsalzlösung benutzt. Dabei ergab sich, dafs die Abgabe des Serumalkalis an das Aufsenwasser bereits nach einigen (zwei resp. sechs) Stunden beendet war. Bei defibriniertem Blut bedurfte es merklich längerer Zeit.

Die Schilfschläuche sind nach dem Gesagten geeignet, das Pergamentpapier in vielen Fällen zu ersetzen. Sie gestatten eine viel raschere und doch nicht minder sichere Trennung von Krystalloiden und Kolloiden. Für die Trennung chemischer Stoffe in gröfserem Mafsstab sind sie ihrer Kleinheit wegen wohl nicht geeignet. Wo es sich aber um kleine Mengen Substanz handelt, so bei forensischen Untersuchungen, oder wo es gilt, das Material zu schonen, sind sie den Pergamentschläuchen weitaus überlegen.

---

[1]) Arch. de Physiol. normale et pathol. 1898.

[2]) Virchows Archiv 33, 95 (1865).

[3]) Verhandlungen d. physik.-med. Ges. z. Würzburg 28 (1894).

VI.

Über die gerinnbaren Stoffe des Eierklars.

Von Dr. **Leo Langstein** aus Wien.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

Neben dem biologischen Interesse, das die Erforschung des dem Hühnerembryo zur Verfügung stehenden, aber auch vom Menschen in gröfster Menge genossenen Nährmaterials bietet, waren praktisch chemische Gesichtspunkte die Veranlassung zu vorliegender Untersuchung. Das Eierklar des Hühnereies ist in beliebiger Menge leicht erhältlich und bildet darum seit alters her ein viel benutztes Ausgangsmaterial zu Untersuchungen über Eigenschaften und chemische Konstitution der Eiweifskörper. Für die Beurteilung der sich dabei ergebenden Resultate ist aber, was ja auch für alle anderen zu gleichem Zweck benutzten, meist ein Gemenge verschiedener Eiweifskörper bildenden Rohstoffe gilt, eine genaue Kenntnis seiner Zusammensetzung notwendig. Sie allein vermag für manche Zwecke den Mangel weniger fühlbar zu machen, der durch die grofse Schwierigkeit gegeben ist, sämtliche Untersuchungen über Eiweifs an krystallisiertem Material durchzuführen.

1. Übersicht der über das koagulierbare Eiweifs des Eierklars bisher angestellten Untersuchungen.

Durch Jahrzehnte wurde das durch Erhitzen koagulierbare Eiweifs des Eierklars als ein einheitlicher Eiweifskörper angesehen und als solcher analysiert. Von den vorliegenden zahlreichen älteren Analysen seien hier nur des Vergleiches wegen die von Scherer, Mulder und Dumas u. Cahours angeführt.

	C	H	N	S	P	O
Scherer	54,883	7,035	15,675	—	—	22,365
Mulder	53,5	7,00	15,5	1,6	0,4	22,0
Dumas u. Cahours . .	53,37	7,1	15,77	—	—	—

Dafs das rohe Eierklar, auch wenn es vorher durch Schlagen von darin suspendierten Membranen befreit war, bei geeignetem Säurezusatz und bei Dialyse einen Niederschlag giebt, welcher sich zum Teil wieder in wässerige Lösung überführen läfst, war zwar schon älteren Autoren aufgefallen, doch haben erst Alexander Schmidt und Aronstein die durch Diffusion und Säure fällbare Substanz als einen eigenen Eiweifskörper, fibrinoplastische Substanz oder Paraglobulin, angesprochen. Nachdem dann Hammarsten und J. Starke gelehrt hatten, sie mit Salzen nach Art des Serumglobulins vom Eieralbumin zu trennen, untersuchte sie Dillner genauer, wobei er beobachtete, dafs sich nur ein Teil der durch Dialyse fällbaren Substanz wie ein Globulin verhält, ein anderer Teil aber an die keratinartige Schalenhaut erinnert. Er bestimmte die Menge der Globuline nach Hammarstens Methode und fand im Maximum 0,815 Proz., im Minimum 0,546 Proz. (Mittel 0,677 Proz.). Dabei gingen die Schwankungen im Globulingehalt den Schwankungen im Gesamteiweifsgehalt parallel.

Das nach Aussalzen der Globuline übrig gebliebene koagulable Eiweifs wurde zunächst als einheitlich angesehen, und wir verdanken einer bei Hammarsten ausgeführten Untersuchung von Starke genaue Angaben über seine Eigenschaften und Zusammensetzung. Danach gerinnt es in etwa 1- bis 3proz. Lösung fast konstant bei 56°, zeigt eine spezifische Drehung von — 37,79° und im Mittel die Zusammensetzung C = 52,25 Proz., H = 6,9 Proz., N = 15,25 Proz., S = 1,93 Proz.

Ein anderes von Hammarsten analysiertes Präparat, bei dessen Darstellung das Globulin nur mit Hülfe von Essigsäure und Kohlensäure entfernt worden war, enthielt blofs 1,47 bis 1,67 Proz. S. Chittenden und Bolton erhielten einerseits nach Entfernung des Globulins durch Salz (A und D), andererseits nach Entfernung desselben mit Hülfe von Säure (B und C) nachstehende Werte:

	A	B	C	D	Mittel
C =	52,21	52,33	52,46	51,74	52,18
H =	6,96	6,98	7,00	6,81	6,93
N =	15,80	15,89	15,88	15,68	15,81
S =	1,94	1,83	1,69	2,02	1,87
O =	23,09	22,97	22,97	23,75	23,21

Nachdem es dann Hofmeister mit Hülfe von Ammonsulfat gelungen war, einen Teil des Eialbumins krystallisiert zu erhalten, erneute sich die Diskussion über die Einheitlichkeit dieses Eiweifskörpers. Während eine Reihe von Untersuchern auf Grund ungleicher physikalischer Konstanten, wie der Koagulationstemperatur und spezifischen Drehung der erhaltenen Fraktionen, das krystallisierte Albumin für ein Gemenge mehrerer Eiweifskörper hält, steht Hofmeister auf Grund seiner Erfahrung diesem Standpunkte ablehnend gegenüber. Die zahlreichen vorliegenden Analysen des krystallisierten Albumins brachten nicht die Lösung dieser Frage; denn fast alle zeigen untereinander gröfsere oder geringere Abweichungen, die besonders im Schwefelgehalt zum Ausdruck kommen. Den Grund der differenten Analysenwerte glaubte Hofmeister im Vorhandensein eines an Schwefel reicheren, amorphen Albumins neben dem krystallisierenden, das von jenem nur durch oftmaliges Umkrystallisieren ziemlich frei zu erhalten ist, gegeben, was insofern seine Bestätigung fand, als die bald darauf erfolgte Entdeckung des Ovomucoids die Anwesenheit eines schwefelreichen, kolloiden und nicht leicht zu beseitigenden Albumoids sicherstellte.

Während Hofmeister mit seinem zuerst geübten Verfahren nur eine geringe Ausbeute an krystallisiertem Ovalbumin erhielt, gelang es ihm später, durch Anregung der Krystallisation mit Hülfe der Krystallaussaat die Ausbeute erheblich zu steigern. Als noch bequemer und vielleicht auch ergiebiger erwies sich dann das „Säure"-Verfahren von Hopkins und Pinkus, so dafs die Frage entstehen konnte, ob nicht das krystallisierte Albumin — ich will es in folgender Betrachtung kurz Ovalbumin nennen — überhaupt im Eierklar den einzigen koagulablen Eiweifskörper neben den Globulinen darstellt.

Die nachstehend mitzuteilenden Untersuchungen verfolgten wesentlich den Zweck, sowohl die Natur der globulinartigen Substanz aufzuklären und auch die Frage zu lösen, ob im Eierklar neben dem Ovalbumin noch ein anderes Albumin vorhanden ist.

Kurz vor Abschlufs meiner Versuche kam ich zur Kenntnis der neuesten einschlägigen Untersuchungen von Osborne und Campbell, welche ein ähnliches Ziel verfolgten. Osborne und Campbell zerlegten Eierklar durch Fraktionierung mit Ammonsulfat in eine grofse Zahl von Fraktionen, von deren jeder sie Gewicht, Zusammensetzung und Gerinnungspunkt ermittelten. Ich behalte mir vor, auf Einzelheiten bei Besprechung meiner Resultate einzugehen, und will hier nur gleich bemerken, dafs sie aus ihren

Resultaten auf die Existenz eines vom Ovalbumin verschiedenen Eiweifskörpers — des „Conalbumins“ — schliefsen. Ebenso folgert Panormoff aus seinen Untersuchungen über Ovalbumin, die ein differentes physikalisches Verhalten des fraktionierten krystallisierten Albumins und Rohalbumins, ebenso wie Verschiedenheiten der Elementaranalyse des „salzsauren“ krystallisierten Albumins und Rohalbumins ergaben, die Anwesenheit zweier verschiedener Albumine im Eierklar. Er schlägt vor, dem krystallisierenden Albumin den Namen Albumin zu lassen, das andere hypothetische Albumin „Albuminin“ zu nennen.

Während die Methode der Salzfällung sich dem Gesagten zufolge auch beim Eierklar für die Trennung der Eiweifsstoffe fruchtbar erwiesen hat, läfst sich von der zu gleichem Zweck empfohlenen Methode der fraktionierten Hitzekoagulation nicht das Gleiche behaupten. Während Gautier im Eierklar zwei, Béchamp drei verschiedene Eiweifskörper durch diese Methode zu isolieren glaubte, ebenso wie Hewlett, stellten Corin und Bérard fünf verschiedene Koagulationstemperaturen im Eierklar fest (57,5°, 67° 72°, 76°, 82°). Die beiden ersteren sollten zwei durch Sättigung mit Magnesiumsulfat isolierbaren Globulinen, von den Autoren als α- und β-Oviglobulin bezeichnet, die drei letzteren Albuminen (α, β und γ) angehören. Diese und ähnliche Angaben sind aber nicht durch Reindarstellung der so charakterisierten Fraktionen fester begründet worden. Ja das zu Grunde liegende Prinzip selbst unterliegt lebhaftem Zweifel und namentlich ist zu bemerken, dafs Ramsden auch an einer Lösung von krystallisiertem Ovalbumin, also einem sicher homogenen Material, bei diesem Verfahren eine ganze Reihe von Ausscheidungen beobachtete, und zwar bei Temperaturen, bei denen auch das rohe globulinhaltige Eierklar gerinnt.

2. Eigene Untersuchungen.

A. Ovoglobulin.

Eine sichere Entscheidung über die Einheitlichkeit des Globulins steht aus, auch seine genaue chemische Definition ist noch nicht gegeben. Inwieweit es mir gelungen ist, unser Wissen in diesen beiden Punkten zu fördern, sei in Folgendem dargelegt.

Zur Darstellung des Eiglobulins verwandte ich die Ausfällung mit Ammonsulfat.

Eierklar wird mit dem gleichen Volumen gesättigter neutraler

Ammonsulfatlösung versetzt, der entstehende Globulinniederschlag nach kurzer Zeit abfiltriert. Eine Reinigung durch wiederholtes Lösen in verdünnter Salzlösung und Ausfällen mit Ammonsulfat ist mit Schwierigkeiten verbunden. Denn selbst bei möglichst rascher Manipulation erweist sich, was auch den Befunden älterer Autoren (z. B. Hoppe-Seylers), dann Dillners, Osbornes entspricht, ein Teil des Niederschlages in verdünnter Salzlösung ebenso wie in schwachem Alkali als unlöslich. Dabei handelt es sich möglicherweise nur um ein partielles Unlöslichwerden eines und desselben Eiweifskörpers. Es ist aber auch der Gedanke nicht abzuweisen, dafs der lösliche und unlöslich gewordene Anteil zwei chemisch differenten Substanzen entsprechen.

Eine Reindarstellung des gelatinös gequollenen, faserigen unlöslichen Anteiles zur Analyse ist fast unmöglich, weil er durch schnelle Verstopfung der Filterporen seine Trennung von dem löslichen Anteil auf dem Wege der Filtration hindert und weil er viel Lösungsflüssigkeit mechanisch einschliefst.

Der durch wiederholtes Lösen und Fällen gereinigte lösliche Anteil des „Gesamtglobulins" zeigt alle Reaktionen echter Eiweifskörper. Er enthält reichlich abspaltbaren Schwefel und zeigt auffallend intensive Furfurolreaktionen. Seine Elementaranalyse*) nach Alkoholkoagulation und Auswaschen bis zum Verschwinden der Schwefelsäurereaktion ergab folgende Werte.

	C	H	N	S	P	O	Asche	Bemerkungen
Präp. I . .	51,46	7,03	15,12	1,64	—	24,75	0,213	im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet
Präp. II . .	51,38	7,11	15,14	1,67	—	24,70	0,187	
Präp. III . .	51,41	7,01	15,18	1,62	—	24,78	0,113	
Präp. IV . .	51,47	6,98	15,21	1,71	—	24,63	0,167	Trocknung b. 110°.

Zum Vergleiche habe ich das durch Ammonsulfat gefällte Globulingemenge, das Gesamtglobulin, analysiert.

Das Präparat wurde auf folgende Weise dargestellt. Eierklar wurde mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt und der entstandene abfiltrierte Niederschlag so lange mit einer Ammonsulfatlösung von 40 Proz. Sättigung gewaschen, bis das abfliefsende Waschwasser keine Biuretreaktion mehr gab. (Dazu sind viele Tage nötig.) Das vom Filter genommene Globulin wurde dann neuerdings in der Reibschale mit Ammonsulfatlösung

*) Analytische Methoden bei diesen und den folgenden Analysen: C und H im zugeschmolzenen Rohr mit vorgelegter Kupferspirale, N nach Dumas, S nach Asboth-Düring, P mit Molybdänsäure und Magnesiamischung.

von der besprochenen Konzentration fein zerrieben, filtriert, und diese Manipulation mehrmals wiederholt, so dafs schliefslich Sicherheit vorhanden war, dafs auf diese Weise alles Ovalbumin und Ovomucoid entfernt wurde, das überhaupt mechanisch zu entfernen geht.

Die Analyse der Gesamtglobulins ergab folgende Werte:

	C	H	N	S	P	O	Asche	Bemerkungen
Präp. I . . .	51,93	7,04	15,17	1,99	—	23,87	0,204	durch Alkohol koaguliert und im Vakuum getrocknet.
Präp. II . .	51,89	7,107	15,09	2,01	—	23,903	0,197	

Beim Vergleich der Analysenwerte dieses Präparates mit denen des durch wiederholtes Lösen und Fällen gereinigten Globulins fällt der höhere S- und C-Gehalt des ersteren auf. Durch dieses Verhalten gewinnt die Vermutung Dillners, das Ovoglobulin bilde ein Gemenge eines schwefelreicheren und schwefelärmeren Eiweifskörpers, an Wahrscheinlichkeit.

Auch Osbornes und Campbells Untersuchungsresultate können in diesem Sinne gedeutet werden.

Die beiden letztgenannten Autoren fraktionierten den durch Halbsättigung mit Ammonsulfat erhaltenen Globulinniederschlag durch Dialyse. Dabei schied sich ein mucinartiger Körper von gummös schleimiger Konsistenz aus, während ein Anteil in Lösung blieb. Ersteren, der den gröfseren Anteil des Globulins darstellt (sie erhielten aus sechs Liter Eierklar ungefähr 34 g), bezeichnen sie als Ovomucin im Sinne von Eichholz*). Ob der bei der Dialyse in Wasser gelöst bleibende Anteil nicht vielleicht bei der Ammonsulfatfällung mitgerissenem Albumin entspricht, lassen Osborne und Campbell unentschieden. Für einen geringen Anteil, den sie in Fraktion A_2 in Form kleinster Nadeln erhielten, mufs dies unbedingt bejaht werden.

Die mangelhafte Übereinstimmung der in folgender Tabelle zusammengestellten Analysenwerte der von Osborne und Campbell und mir analysierten Globulinpräparate läfst sich wohl nur in dem Sinne deuten, dafs weder die von den beiden amerikanischen Forschern noch die von mir angewandte Methodik eine exakte Trennung der vorhandenen Eiweifskörper erzielt.

*) Hierüber soll weiter unten noch die Rede sein.

	C	H	N	S	P	O	Asche	
Ovomucin Präp. I	50,69	6,71	14,49	2,28	Spuren	25,83	0,53	Osborne u. Campbell
„ „ II	50,95	6,85	14,82	1,938	—	25,442	1,41	
Lösl. Globulin . .	52,67	7,12	15,48 15,58	1,687	0,123	22,77	0,41	
Lösl. Globulinanteil	51,43	7,04	15,16	1,66	—	24,7	—	Langstein.
Gesamtglobulin . .	51,91	7,07	15,13	2,00	—	23,886	—	

Eine partielle Löslichkeit des durch Dialyse aus dem Gesamtglobulinniederschlag ausfällbaren Eiweifskörpers, die je nach den äufseren Bedingungen Schwankungen unterworfen ist, könnte uns die mangelhafte Übereinstimmung der Analysenzahlen am besten erklären. Sie ist wohl auch der Grund der Widersprüche in den Behauptungen von Dillner, Eichholz, Osborne und Campbell, von denen der erste sagt, dafs der gröfste Teil des durch Dialyse ausfällbaren Globulinanteiles sich in verdünnter Kochsalzlösung löse, während Eichholz die Menge des Ovomucins als eine sehr geringe bezeichnet, und Osborne und Campbell von diesem Körper sagen:

„This substance precipitated by diluting egg white, was heretofore been regarded as globulin, but we find that nearly, if not quite, all of that which is so precipitated, is ovomucin.“

Dieser Sachlage gegenüber erschien es nicht aussichtslos, durch Anwendung der Methodik der fraktionierten Fällung mit Ammonsulfat*) in der im hiesigen Institut üblichen Weise eine Entscheidung zu suchen, ob zwei oder mehr Globuline im Eierklar vorhanden sind.

Der Versuch ergab in nativem, nicht neutralisiertem Eiklar mit gegen Lakmoid neutralem Ammonsulfat ausgeführt:

Bei 24 Proz. Sättigung bildete sich eine Opaleszenz, die bei Vermehrung des Salzes weiter zunahm; bei 36 Proz. war die Ausfällung dieser ersten Fraktion zu Ende. Eine zweite Fraktion begann erst bei 54 Proz. zu fallen; die Ausfällung war bei 70 Proz. Sättigung beendet. Bei einem Salzgehalt von 60 Proz. Sättigung ist der rötliche Farbstoff des Eierklars vollständig ausgefällt. Der Versuch giebt somit nur zwei Fraktionen.

Fraktion I (24 bis 36 Proz. Sättigung) umfafst die Summe der globulinähnlichen Stoffe, Fraktion II (54 bis 68 Proz. Sättigung) das Gemenge von Albumin und Ovomucoid. Innerhalb der beiden Fraktionen ist durch die Methode der Salzfällung bei Verwendung von Ammonsulfat eine weitere Trennung nicht zu erreichen.

Wird zur Fraktionierung mit Essigsäure neutralisiertes Eierklar

*) Bezüglich der Methodik sei auf die Arbeiten von E. P. Pick, Zeitschr. f. physiol. Chemie 24, 246 verwiesen.

verwendet, so verschieben sich die Fällungsgrenzen nur unwesentlich nach unten.

Bei Anwendung einer gegen Lakmoid wenn auch nur schwach sauer reagierenden Ammonsulfatlösung beginnt die Fällung des Globulins bei einem Salzgehalt von 18 Proz. Sättigung, die des Albumins bei einem Salzgehalt von 40 Proz. Sättigung, so dafs die Anwesenheit eines zweiten Globulins durch die starke Verschiebung der unteren Fällungsgrenze des Albumins vorgetäuscht werden kann. Ich selbst verfiel einmal diesem Irrthum, der sich durch die Übereinstimmung der Analysenzahlen dieses zweiten vermeintlichen Globulins mit denen des krystallisierten Albumins aufklärte.

Einen Fortschritt in der Kenntnis der Eiglobuline konnte ich jedoch durch Verwendung von Kaliumacetat als Fällungsmittel erreichen. Dasselbe ist zuerst von Lewith auf Veranlassung von Hofmeister zur Untersuchung von Eiweifskörpern herangezogen worden. Gelegentlich seiner Untersuchungen über die Wirkung der Salze hat dann Hofmeister selbst das Verhalten des Eierklars gegen Kaliumacetat geprüft und dabei unter Anwendung einer Lösung von 102,4 g Kaliumacetat in 100 ccm gefunden, dafs 1,6 ccm auf 10 ccm Gesamtlösung nach langem Stehen, 2,4 ccm sofort Trübung geben. In jüngster Zeit hat dasselbe Salz durch Fuld und Spiro zur Trennung der im Serum vorhandenen Globuline Verwendung gefunden.

Bei meinen Versuchen, bei denen eine kaltbereitete gesättigte Lösung von Kaliumacetat*) (Kal. acet. cryst. — Merck) zur Verwendung kam, fand ich die untere Fällungsgrenze, durch eine Opaleszenz angedeutet, bei einem Gehalt, der 20 Proz. Sättigung entsprach. Bei 24 Proz. Sättigung Trübung, bei 26 Proz. Sättigung starke Trübung, darüber hinaus bildete sich beim Stehen ein sich absetzender Niederschlag, bei 50 Proz. Sättigung war, wie die Prüfung des Filtrates ergab, die Ausfällung dieser ersten Fraktion beendet. Erst bei einer viel höheren Konzentration, bei 70 Proz. Sättigung, begann eine weitere Eiweifsfraktion auszufallen, die aber bei weiterem Zusatz bis zu 90 Proz. Sättigung nicht ganz zur Abscheidung zu bringen war.

Von vornherein war zu vermuten, dafs die zuerst ausfallende Fraktion dem durch Ammonsulfat fällbaren Globulingemenge entspreche. Um darüber Klarheit zu gewinnen, wurde untersucht, 1. ob die Menge des durch Kaliumacetat innerhalb der angeführten

*) Die Bereitung der Kaliacetatlösung in der Wärme, namentlich aber Eindampfen derselben ist zu vermeiden, weil die Lösung sonst durch Abgabe von Essigsäure zu alkalisch wird.

Fällungsgrenzen erhältlichen Globulins mit der Menge des durch Ammonsulfat fällbaren zusammenfällt, 2. ob das mit den beiden Fällungsmitteln erhaltene Globulin die gleiche Zusammensetzung aufweist.

Beide Versuchsanordnungen zeigten, dafs der durch Kaliumacetat fällbare Niederschlag von dem durch Ammonsulfat erhältlichen merklich verschieden ist.

Je 20 ccm natives Eierklar wurden mit dem gleichen Volumen neutraler Ammonsulfat- resp. Kaliacetatlösung versetzt. Der Niederschlag wurde von der Flüssigkeit durch Zentrifugieren getrennt; diese wurde abgegossen, der Niederschlag neuerdings in halbgesättigter Ammonsulfat- resp. Kaliacetatlösung aufs feinste suspendiert und neuerlich durch Zentrifugieren zum Absetzen gebracht. Dieses Verfahren wurde so lange wiederholt, bis die Salzlösungen keine Biuretreaktion mehr zeigten. Hierauf wurde der Niederschlag durch bei 100° getrocknete, gewogene Filter filtriert, Filter samt Niederschlag durch eine halbe Stunde im Trockenkasten einer Temperatur von 100° ausgesetzt und hierauf so lange mit heifsem, destilliertem Wasser gewaschen, bis sich im Waschwasser nach dem Abdampfen kein Salzrückstand mehr nachweisen liefs. Filter und Niederschlag wurden hierauf bei 100° getrocknet und gewogen.

Von jeder Probe wurden Doppelbestimmungen ausgeführt, die befriedigend übereinstimmten.

Ich fasse die in drei verschiedenen Eiweifslösungen gefundenen Werte in folgender kleiner Tabelle zusammen.

In 20 ccm Eierklar sind enthalten:

	Durch Ammonsulfat fällbares Globulin	Durch Kaliacetat fällbares Globulin	Euglobulin in Proz. des Gesamtglobulins
I. Probe . . .	0,1575 g	0,0995 g	63,2 Proz.
II. „ . . .	0,1697 „	0,1156 „	68,1 „
III. „ . . .	0,1598 „	0,1023 „	64,2 „

Um den Einflufs der Verdünnung auf eine eventuelle Änderung der gefundenen Werte zu studieren, wurden von Probe II und III je 10 ccm Eierklar mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und dann erst mit dem gleichen Volumen Ammonsulfat- resp. Kaliacetatlösung behandelt. Dabei erhielt ich folgende Werte:

In je 10 ccm mit dem gleichen Volumen Wasser verdünntem Eierklar sind enthalten

	Durch Ammonsulfat fällbares Globulin	Durch Kaliacetat fällbares Globulin	Euglobulin in Proz. des Gesamtglobulins
II. Probe . . .	0,0812 g	0,0543 g	66,8 Proz.
III. „ . . .	0,0743 „	0,0498 „	67,0 „

Wir finden demnach in sämtlichen Proben, dafs die Menge des durch Ammonsulfat fällbaren Globulins über die des durch Kaliumacetat fällbaren in einem konstant bleibenden Verhältnis überwiegt. Die Menge des Ammonsulfatglobulins schwankt zwischen 0,7 und 0,8 Proz. Sie stimmt gut mit der von Dillner durch Anwendung der Magnesiumsulfatfällung erhaltenen überein. Die Menge des durch Kaliacetat fällbaren Globulins beträgt ungefähr 0,5 Proz. und mit auffallender Regelmäfsigkeit fast genau zwei Drittel des gesamten durch Ammonsulfat fällbaren Globulins. Nach Analogie der beim Blutserum gefundenen Verhältnisse kann man dieses Globulin als Euglobulin bezeichnen, dem jedoch, wie hier gleich bemerkt werden soll, kein Pseudoglobulin entspricht.

Die Eigenschaften dieses Euglobulins sind aus Folgendem ersichtlich.

Biuretreaktion, Xanthoproteïnreaktion, Millonsche Reaktion, Adamkiewiczsche Reaktion positiv. Abspaltbarer Schwefel reichlich vorhanden. Auffallend starke Reaktion nach Molisch. Es fällt durch Dialyse, bei Einleitung von CO_2 und vorsichtigem Zusatz verdünnter Essigsäure, löst sich im Überschufs der Säuren und in verdünnter Salzlösung, hat jedoch, ähnlich manchen anderen Eiweifskörpern, die Eigenschaft, unter Abscheidung feinster Fäserchen leicht in eine unlösliche Modifikation überzugehen.

Koagulationstemperatur in 2 proz. Lösung 64 bis 67°.

Die Elementaranalyse zweier durch viermaliges Umfällen gereinigter mit Alkohol koagulierter Präparate ergab folgende Zahlen:

	C	H	N	S	P	O	Asche
I. Präparat im Vakuum zur Gewichtskonstanz getrocknet .	49,86	7,103	14,31	1,72	—	27,007	0,231
II. Präparat bei 110° getrocknet	49,91	7,086	14,41	1,75	—	26,844	0,324

Vergleicht man diese Zahlen mit jenen, die bei Analyse des Gesamtglobulins erhalten wurden, so bemerkt man einen auffälligen Unterschied, insofern Kohlenstoff- und Stickstoffzahlen beim Euglobulin tiefer, die Sauerstoffzahlen viel höher liegen; dennoch ist das gegenseitige Verhältnis von C:N nur unwesentlich, wohl innerhalb der Fehlergrenze der Analyse verschoben (398 und 405 C : 100 N). Es könnte sich sonach möglicherweise nur um einen gröfseren Wassergehalt des mit Kaliumacetat fällbaren Körpers handeln. Da die quantitative Bestimmung gezeigt hat, dafs das Euglobulin fast genau zwei Drittel des Gesamtglobulins bildet, so

war zu erwarten, das fehlende Drittel in dem Filtrat des Kaliacetatniederschlages aufzufinden. Dies gelang jedoch nicht. Nach Entfernung des Kaliumacetats mit Hülfe der Dialyse konnte kein Pseudoglobulin durch Ammonsulfat mehr gefällt werden. Dieser Befund kann in der Art gedeutet werden, dafs die Behandlung mit dem alkalisch reagierenden Kaliumacetat eine Veränderung einleitet — es könnte sich dabei um Umsetzung des Kaliacetats mit einer salzartigen Verbindung zweier Eiweifsstoffe handeln, bei dem ein durch Kaliumacetat und Ammonsulfat fällbares Globulin neben einem dadurch nicht fällbaren Eiweifskörper resultiert.

Wie aus den angeführten Reaktionen zu ersehen ist, ist das chemische Verhalten dieses Euglobulins nicht von dem anderer koagulabler Eiweifskörper verschieden. Auffallend ist allenfalls der intensive Ausfall der Furfurolreaktionen, welcher auf einen erheblichen Kohlehydratgehalt hinweist. Dies gab Veranlassung, trotz der kleinen Ausbeute an diesem Eiweifskörper, die Natur dieses Kohlehydrates zu untersuchen.

Die Menge des von mir zu diesem Zweck verwendeten „Euglobulins“ betrug ungefähr 25 g.

Dasselbe wurde durch dreimaliges Umfällen gereinigt, durch Alkohol koaguliert, ausgewaschen und nach Trocknung bei 110° fein gepulvert.

Zur Abspaltung der Kohlehydratgruppe benutzte ich in Anlehnung an die Versuche Friedrich Müllers und Seemanns ungefähr 3 proz. Salzsäure. Durch Vorversuche an je 3 g Euglobulin konnte ich mich überzeugen, dafs eine der Säurespaltung vorhergehende Quellung in Alkali nicht von wesentlichem Einfluss auf die Menge des abspaltbaren Kohlehydrates ist. In diesem Punkte ist demnach ein Unterschied vom krystallisierten Ovalbumin gegeben.

Auffallend war die in kürzester Zeit auftretende reichliche Melaninbildung bei der Spaltung des Euglobulins durch verdünnte Salzsäure. Die Schwarzfärbung der Zerkochungsflüssigkeit machte eine quantitative Bestimmung des abgespaltenen Zuckers durch eine der Titrationsmethoden unmöglich. Zum Ziele führte ein von Dr. von Fürth im hiesigen Institute anläfslich seiner noch nicht veröffentlichten Untersuchungen über die Kohlehydratgruppen in den Stützsubstanzen niederer Thiere ausgearbeitetes Verfahren. Er hat mir dasselbe für meine Untersuchung überlassen und die vorläufige Mitteilung des Verfahrens gestattet, wofür ich ihm auch an dieser Stelle bestens danke.

Es besteht in Folgendem:

Die Zerkochungsflüssigkeit wird mit Phosphorwolframsäure gefällt, von den unlöslichen Phosphorwolframaten scharf abgesaugt, und im Filtrat die überschüssige Säure durch eine Lösung von krystallisiertem Albumin ausgefällt. Nach Abfiltrieren wird mit Lauge genau neutralisiert, wobei der eventuell zugesetzte Überschufs an Eiweifs herausfällt. Auf diese Weise resultiert eine eiweifsfreie, wasserklare Lösung des abgespaltenen Zuckers, dessen Menge nach Fehling oder Knapp bestimmt werden kann.

Ich fand in je 3 g Euglobulin nach

$^1/_2$	stündiger	Säurespaltung	8,43 Proz.	Zucker auf Glukose berechnet (Fehling)
2	„	„	8,72 „	Zucker auf Glukose berechnet (Fehling und Knapp)
3	„	„	8,134 „	Zucker auf Glukose berechnet (Fehling).

Zur Charakterisierung des abspaltbaren Kohlehydrates wurde die eiweifsfreie Zuckerlösung nach Baumann benzoyliert. Das reichlich ausgeschiedene weifse Benzoylprodukt wurde durch Absaugen von der Flüssigkeit getrennt, mit verdünntem Ammoniak und Wasser gewaschen, getrocknet und in heifsem, absolutem Alkohol aufgelöst. Aus der allmählich erkaltenden, leicht gelbgefärbten alkoholischen Lösung krystallisierten bald ziemlich reichlich seidenglänzende Nadeln, die aus heifsem Alkohol einmal umkrystallisiert wurden.

Ihr Schmelzpunkt lag bei 201 bis 202°.

Der Stickstoffgehalt an 0,113 g Substanz nach Dumas bestimmt, betrug 1,954 Proz.

Dieses Verhalten lehrt, dafs Pentabenzoylglykosamin vorlag.

Berechnet man auf Grund des für das gespaltene Euglobulin gefundenen Reduktionsvermögens den Gehalt an Glykosamin, so ergiebt sich ungefähr 11 Proz.

Der Nachweis des Glykosamins in dem Euglobulin des Eierklars reiht sich den entsprechenden Befunden am Ovalbumin und Ovomucoid an.

Wie aus dem Angeführten hervorgeht, läfst sich in dem durch Ammonsulfat erhältlichen Niederschlag unterscheiden:

1. ein in Kochsalzlösung nachträglich nicht mehr löslicher Körper, dessen Eigenschaften und Zusammensetzung bisher nicht feststehen;

2. ein in Kochsalzlösung löslicher Körper, der sich durch Behandlung mit Kaliumacetat in ein Euglobulin und einen nicht mehr durch Halbsättigung mit Ammonsulfat fällbaren Körper zerlegen läfst.

Dem gegenüber ist es am Platze, mit einigen Worten auf das

Ovomucin Eichholz' und das krystallisierende Globulin Panormoffs einzugehen.

Eichholz fällt, wie schon erwähnt, sein Ovomucin durch Verdünnen des Eierklars mit 3 Vol. H_2O und centrifugiert den Niederschlag ab. Derselbe hat folgende Eigenschaften:

Er ist in verdünnter Sodalösung löslich, kann durch Essigsäure aus ihr wieder gefällt werden. In verdünnter Kochsalzlösung quillt er zu einer visciden, schleimigen Masse. Er ist durch Hitze bei Gegenwart von Essigsäure koagulierbar. Das Koagulum quillt in Kalkwasser, wird durchscheinend, löst sich jedoch nicht vollständig in ihm.

Dafs das Ovomucin eine abspaltbare Kohlehydratgruppe enthält, konnte Eichholz durch Darstellung eines Osazons nach dem Zerkochen mit verdünnter Säure nachweisen. Dasselbe schmolz von 199 bis 202°.

Osborne und Campbell, welche fast den gesamten, durch Halbsättigung mit Ammonsulfat fällbaren Niederschlag als Ovomucin ansehen, geben an, dafs dieser Körper durch Alkohol ausfällt, getrocknet nachträglich in Kochsalzlösung wieder in Lösung gehe, dabei keine viscide Lösung liefert, die bei 75° sich trübt und bei 78° Flocken abscheidet, die jedoch beim Kochen fast ganz in Lösung gehen und beim Erkalten wieder erscheinen.

Ich habe die Angaben von Eichholz nachgeprüft und nicht den Eindruck erhalten, dafs der von ihm beschriebene Körper den Eigenschaften nach einem Mucin entspricht. Von einem Schleimstoff erwartet man zum mindesten, dafs er fadenziehende Lösungen liefert, dafs er durch Essigsäure ausfällt, sich im Überschufs nicht leicht wieder löst. Auch ist ein Mucin, das aus Salzlösung durch Verdünnen derselben ausfällt, nie beschrieben worden. In all dem weicht das „Ovomucin" von den nativ vorkommenden Mucinen ab. Es bleibt somit als Motiv für die Bezeichnung Ovomucin nur die Abspaltbarkeit eines Kohlehydrates übrig. Es dürfte aber zu einer verhängnisvollen Verwirrung führen, wenn man alle Kohlehydrat abspaltenden Eiweifsstoffe als Mucine bezeichnen wollte. Vor allem müfste man die im Tierreich vorkommenden Eiweifsstoffe mit wenigen Ausnahmen als Mucine bezeichnen und es würde z. B. das Albumen des Eis, das „Eiweifs" als anatomischer Begriff, dann überhaupt kein Eiweifs, sondern nur Mucine enthalten.

Die Untersuchungen Panormoffs aus jüngster Zeit betreffen scheinbar auch das Globulin.

Die Methodik seiner Globulindarstellung ist folgende *).

Das Eierklar wird mit $^1/_3$ bis $^1/_4$ Vol. Wasser verdünnt, durch Kattun filtriert, mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Ammonsulfatlösung versetzt und einen Monat lang stehen gelassen. Der Niederschlag wird abgepreſst, mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung ausgezogen, und die Lösung in einer flachen Schale zur Verdunstung hingestellt, wobei sich binnen einer Woche ein aus mikroskopischen Nadeln bestehender Niederschlag abscheidet.

Durch Ausfrieren des Eierklars (230 ccm), Auftauen, Versetzen mit 100 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung, Abfiltrieren der leichten Trübung,

*) Fast wörtlich nach dem Referat in Malys Jahresbericht.

Abpressen des nach Zusatz weiterer 130 ccm Salzlösung ausfallenden Niederschlages, Ausziehen des letzteren mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung und Krystallisierenlassen des Auszuges erhielt Panormoff ebenfalls feine Nädelchen. Das so erhaltene „krystallisierte Globulin" wurde gegen 0,2 proz. Kochsalzlösung dialysiert, und die salzsaure Verbindung durch Äther, Alkohol gefällt.

Zusammensetzung: 50,8 Proz. C, 73,92 Proz. H, 15,13 Proz. N, 2,84 Proz. Cl, 1,669 Proz. S.

„Das so erhaltene Globulin ist in seinen Eigenschaften wie in seinem Verhalten mit dem krystallisierten Albumin identisch." Panormoff hält demnach das Eiglobulin für ein Gemisch eines noch unbekannten Körpers mit krystallisiertem Albumin.

Dieses Resultat gestattet wohl eine einfachere Deutung. Der Umstand, dafs das krystallisierende Globulin durch halbgesättigte Ammonsulfatlösung ausgezogen war — worin sich die Eiglobuline überhaupt nicht lösen — und dafs die Krystallisation durch Säurezusatz beschleunigt wird, läfst kaum einen Zweifel, dafs es sich um Ovalbumin gehandelt hat, welches dem ersten Globulinniederschlag naturgemäfs reichlich beigemischt sein mufste.

B. Ovalbumin.

Das Ziel vorliegender Untersuchungen über das Ovalbumin war die Beantwortung zweier die Diskussion der letzten Jahre über diesen den Hauptbestandteil des Eierklars bildenden Eiweifskörper beherrschenden Fragen, die kurz formuliert folgendermafsen lauten:

I. Ist das krystallisierte Ovalbumin Hofmeisters ein einheitlicher Eiweifskörper?

II. Existiert neben diesem im Eierklar präformiert noch ein anderes Albumin von abweichender Zusammensetzung?

Eine sichere Entscheidung in diesen beiden strittigen Punkten hat eine vollständige Abscheidung des krystallisierten Albumins zur Voraussetzung. Ich mufs daher vor allem auf diese mit ein paar Worten eingehen.

Für meinen Zweck kam vor allem die rasch ausführbare Modifikation von Hopkins und Pinkus zur Darstellung von Ovalbumin in Betracht. Diese Autoren erreichten auf Zusatz von Essigsäure zu der mit Ammonsulfat halb gesättigten Albuminlösung bis zur beginnenden Trübung binnen 24 Stunden die Abscheidung von Krystallen in einer Ausbeute von 30 bis 40 g pro Liter Hühnereiweifs.

Es sei mir gestattet, das von mir angewandte Verfahren, wie es sich bei Krystallisation von vielen Hundert Gramm Ovalbumin bestens bewährt hat, kurz zu skizzieren.

Durch Schlagen von den Membranen befreites, klar filtriertes Eierklar wird mit dem gleichen Volumen einer gegen Lakmoid absolut neutral reagierenden Ammonsulfatlösung versetzt*).

Nach ungefähr einer halben Stunde wird vom Globulinniederschlag abfiltriert. Die klare meist rötlich gefärbte Albuminlösung wird nun mit einem Fünftel Normal-Schwefelsäure bis zur dichten Trübung versetzt (ich gehe so weit, dafs die Flüssigkeit undurchsichtig weifs wird). Nachdem dies geschehen ist, impft man zweckmäfsigerweise mit ein paar vorrätigen in Ammonsulfatlösung aufgeschwemmten Albuminkrystallen. Es ist dies zwar nicht unumgänglich notwendig, beschleunigt jedoch die Krystallisation ungemein. Gewöhnlich nach fünf bis sechs Stunden ist das Glas mit einem dichten krystallinischen Niederschlag erfüllt, der in den nächsten zwölf Stunden zunimmt. Nach dieser Zeit ist jedoch die Abscheidung von Krystallen meist beendigt.

Das Umkrystallisieren erleichtert man sich ebenfalls durch Impfung mit vorrätig gehaltenen Krystallen und durch Verwendung einer schwach sauer reagierenden Ammonsulfatlösung. Es gelingt so auch, das Ovalbumin beliebig oft umzukrystallisieren.

Die Ausbeute an bei 100° getrocknetem Ovalbumin beträgt bei diesem Verfahren 35 bis 40 g aus einem Liter Eierklar nach einmaligem Umkrystallisieren.

Nach den Erfahrungen, die sowohl ich als auch andere mit krystallisierendem Albumin arbeitende Herren in Hofmeisters hiesigem Institut machen konnten, ist das Gelingen der Krystallisation von der Temperatur des Raumes, in dem sie vorgenommen wird, abhängig. Ich habe wiederholt zu meinem Schaden gesehen, dafs bei sonst ganz gleichem Vorgehen die Krystallisation ausblieb, wenn die halbgesättigte angesäuerte und mit Krystallen geimpfte Eiweifslösung im Winter im kalten Raum gelassen wurde. Ins warme Laboratorium gebracht, liefs sie dann eventuell einen — aber amorphen — Albuminniederschlag ausfallen, der sich nachträglich nur zum Teil in Krystalle überführen liefs. Es empfiehlt sich also, die Krystallisation im Winter bei einer Temperatur von 15 bis 20° vorzunehmen, jedenfalls aber lange in der Kälte gestandene, mit Ammonsulfat halbgesättigte Albuminlösung vor dem Zusatz von Schwefelsäure zum Zweck der Krystallisation auf Zimmertemperatur zu bringen. Andere Umstände vermögen nach meinen Erfahrungen die Krystallisationsfähigkeit nicht zu beeinträchtigen. Sowohl aus mit Kalkwasser versetztem, als auch selbst aus vier Wochen gestandenem, durch Zusatz von Toluol vor Fäulnis geschütztem Eierklar kann man nach dem eben beschriebenen Verfahren Krystalle erhalten.

Es ist jedoch bei aller Übung und Sorgfalt nicht möglich, das gesamte Albumin des Eierklars in krystallisierter Form zu erhalten. Versetzt man die von den Krystallen abfiltrierte klare

*) Das Eierklar jedes einzelnen Eies mufs auf seine Reaktion geprüft werden; zur Verwendung kommen darf nur gegen Lakmus alkalisch reagierendes Eierklar; ich habe mich oft überzeugen können, dafs sauer reagierendes Eierklar nicht krystallisationsfähig ist, wie auch seine Beimengung zu alkalisch reagierendem die Krystallisation zu hindern vermag.

Mutterlauge, wenn sie nach wochenlangem Stehen keine Krystalle mehr abscheidet, mit einer der zugesetzten Säuremenge äquivalenten Menge von gesättigter Ammonsulfatlösung oder auch mit mehr Säure, so erhält man Niederschläge, die amorph sind und keine Krystalle mehr einschliefsen. Auf diesen Albuminanteil komme ich im nächsten Abschnitt zurück.

Die zahlreichen über das krystallisierte Ovalbumin vorliegenden Analysen zeigen keine gute Übereinstimmung. Ich stelle sie in folgender Tabelle zusammen.

	C	H	N	S	P	O	Bemerkungen
Hofmeister	53,21	7,21	14,92	1,01	—	—	nach seiner Methode dargestellt, mehrmals umkrystallisiert.
	53,36	7,31	15,06	1,18			
Bondzynski u. Zoja	52,01	6,98	15,11	1,61	0,12	—	nach Hofmeister Methode dargest., nicht umkrystallis. Fraktion.
	52,44	7,26	15,58	1,70			
Hopkins	52,75	7,12	15,43	1,57	—	23,13	nach der Methode von Hopkins u. Pinkus.
Osborne und Campbell	52,75	7,10	15,51	1,62	0,12	22,90	Durchschnittszahl.
	52,82	7,03	15,32	1,59	0,123	23,117	nach Hofmeisters Methode 6 mal umkrystallis.
	52,78	7,07	15,53	1,651	0,112	22,857	nach Hofmeisters Methode 4 mal umkrystallis.
Schulz	52,26	7,4	15,19	1,23	—	23,92	

Die von Bondzynski und Zoja mitgeteilten Beobachtungen über verschiedene Löslichkeit wie auch ungleiche physikalische Konstanten des krystallisierten Albumins, ebenso die Untersuchungen von Hopkins und Pinkus, die Unterschiede in dem Bromabsorptionsvermögen desselben fanden, zusammengehalten mit der mangelhaften Übereinstimmung der von verschiedenen Forschern beigebrachten Analysenzahlen führten zur Annahme der Präexistenz verschiedener krystallisierter Albumine im Hühner-Eierklar.

Hammarsten steht auf dem Boden von Bondzynski und Zoja, dafs das krystallisierte Ovalbumin ein Gemenge mehrerer Albumine von etwa derselben chemischen Zusammensetzung, aber von verschiedener Gerinnungstemperatur, Löslichkeit und spezifischer Drehung ist. Hofmeister nimmt dem gegenüber einen ablehnenden Standpunkt ein. Er hat, ebenso wenig wie Wichmann, ein ungleiches Löslichkeitsvermögen verschiedener Fraktionen des krystallisierten Ovalbumins bemerkt.

Um eine Klärung dieser Sachlage herbeizuführen, schlug ich folgende Wege ein.

Ich untersuchte 1., ob die vorausgesetzte Existenz von verschiedenen krystallisierten Albuminen nebeneinander bei der fraktionierten Salzfällung eines oft umkrystallisierten Präparates zum Ausdruck käme.

Ich ermittelte 2. die elementare Zusammensetzung oft umkrystallisierter Ovalbuminpräparate.

Ad 1. Zur fraktionierten Salzfällung benutzte ich fünfmal nach der Säuremethode umkrystallisiertes Ovalbumin. Dasselbe wurde schliefslich zu einer 10 proz. Lösung in Wasser gelöst, gegen destilliertes Wasser bei 0° bis zur fast völligen Entfernung der Schwefelsäurereaktion dialysiert und hierauf auf die natürliche Alkaleszenz des nativen Eierklars gebracht. Nach Scholl entspricht diese einem Gehalt von 0,225 Na_2CO_3 pro 100 g Albumin, J. Schütz verbrauchte durchschnittlich 4 ccm 1 proz. HCl zur Abstumpfung der natürlichen Alkaleszenz für je 10 ccm Eierklar.

Bei der Bestimmung der Fällungsgrenze ergab sich eine ganz ungewöhnliche Schärfe derselben.

Es tritt bei 62 proz. Sättigung die erste Opaleszenz ein, bei 64 proz. Sättigung dichte Fällung, bei 68 proz. Sättigung war die Ausfällung zu Ende. Ferner fällt auf, dafs ganz im Gegensatz zu den nativen Eiweifsgemengen die untere und obere Fällungsgrenze einander sehr nahe stehen, was auf ein sehr gleichmäfsiges Verhalten des gelösten Eiweifsstoffes gegen Salzzufuhr hinweist und mit der Annahme mehrerer Albumine nur unter der willkürlichen Voraussetzung vereinbar ist, dafs diese in ganz gleicher Weise durch Salz gefällt werden.

Ad 2. Zur Analyse gelangte ein achtmal und ein zehnmal umkrystallisiertes Präparat.

Diese wurden, nachdem die Mutterlauge scharf abgepreſst war, in möglichst wenig Wasser gelöst, bei möglichst niederer Temperatur gegen destilliertes Wasser so lange dialysiert, bis die Eiweifslösung, mit Chlorbaryum versetzt, nicht die Spur einer Trübung erkennen liefs. Hierauf wurde sie durch Eingiefsen in Alkohol koaguliert und das Koagulum mehrere Tage lang mit heifsem destilierten Wasser gewaschen. Ein Teil eines jeden Präparates wurde im Vakuum, ein anderer bei 110° getrocknet und von jedem wurden zwei Analysen ausgeführt. Diese ergaben folgende Werte:

	C	H	N	S	P	O	Asche	Bemerkungen
Präp. I, 8 mal umkrystallis.	52,43	7,26	15,22	1,32	—	23,77	0,101	im Vakuum getrocknet
	52,47	7,19	15,36	1,38	—	23,60	0,121	bei 100° getrockn.
Präp. II, 10 mal umkrystallis.	52,46	7,19	15,29	1,31	—	23,75	0,098	im Vakuum getrocknet
	52,49	7,14	15,31	1,35	—	23,71	0,103	bei 100° getrockn.
Mittel	52,46	7,19	15,29	1,34	—	23,72	—	

Die Übereinstimmung der Zusammensetzung der zwei Präparate ist so befriedigend, dafs von weiterem Umkrystallisieren abgesehen wurde. Die Zahlen stimmen sehr nahe zu den von Schulz erhaltenen. Sie weichen jedoch sowohl von der ursprünglichen Angabe von Hofmeister, wie auch von jenen von Hopkins-Pinkus und von Osborne und Campbell weiter ab, als durch erlaubte Analysenfehler erklärt werden kann. Ich kann jedoch auf diesen Punkt erst eingehen, soweit dies nötig ist, wenn ich über die Zusammensetzung der das Ovalbumin begleitenden Eiweifskörper gesprochen habe.

C. Der nichtkrystallisierende Albuminanteil.

Wenn es auch gelingt, durch das Verfahren von Hopkins und Pinkus mehr als die Hälfte des Eialbumins in krystallisiertem Zustand zu erhalten, so ist das für den anderen Teil unmöglich. Es handelt sich nun darum, zu entscheiden, ob dieses nicht zur Krystallisation kommende Albumin seiner Zusammensetzung nach mit dem krystallisierten identisch ist, beziehungsweise einen aus äufseren Gründen nicht mehr zur Krystallisation gelangenden Rest desselben darstellt, oder aber einen anderen Eiweifskörper. Um ihn zu isolieren, schlug ich folgendes Verfahren ein.

Nachdem sich aus der Mutterlauge, die das krystallisierende Albumin abgeschieden hatte, keine Krystalle nach monatelangem Stehen mehr ausschieden, wurde sie gegen fliefsendes Wasser bis zur fast vollständigen Entfernung der Schwefelsäurereaktion dialysiert und dann bei ca. 50 bis 60° auf dem Wasserbade erhitzt. Dabei schied sich ein Teil des in der Lösung vorhandenen Albumins in Flocken aus, der abfiltriert und gesondert untersucht wurde. Ein anderer Teil koagulierte erst bei einer Temperatur von ungefähr 20°. Beide Teile wurden tagelang mit heifsem Wasser bis zum Verschwinden der Schwefelsäurereaktion und bis zum negativen

Ausfall der Phosphorwolframsäurefällung im Filtrate ausgewaschen und, bei 110° getrocknet, der Analyse unterworfen. Qualitativ verhält sich dieses Albumin wie das krystallisierte. Seine elementare Zusammensetzung ergab sich wie folgt:

	bei 60° koagul.		bei höherer Temperat. koagul.	
C =	52,19	52,32	52,32	52,29
H =	6,89	6,97	6,96	7,05
N =	15,99	16,03	15,92	16,01
S =	1,76	1,81	1,69	1,74
O =	23,17	23,27	23,11	22,91
P =	—	—	—	—

Im Vergleich zum krystallisierten Albumin enthält dieses Albumin somit weniger C, bedeutend mehr N und S. Die Zahlen stimmen gut mit den von Osborne und Campbell für den nichtkrystallisierbaren Albuminanteil erhaltenen überein, den diese Autoren Konalbumin nennen. Osborne und Campbell waren zur Feststellung dieses Eiweifskörpers durch Analyse der nicht mehr krystallisierenden Fraktion gelangt. Ich stelle ihre und meine Durchschnittsanalysenwerte vergleichsweise nebeneinander:

	C	H	N	S	O
Osborne und Campbell	52,25	6,99	16,11	1,70	22,95
Langstein	52,23	6,96	15,98	1,75	23,08

Die beiden amerikanischen Forscher fanden auch die physikalischen Konstanten des „Konalbumins“ von denen des krystallisierenden verschieden, eine etwas niedrigere Koagulationstemperatur, aber wesentlich höhere spezifische Drehung. Ob es sich bei dem „Konalbumin“ um einen einheitlichen Körper oder ein noch nicht getrenntes Gemenge von zwei oder mehreren handelt, ist vorläufig nicht zu entscheiden.

Die analytischen Zahlen ermöglichen einigermafsen die Beurteilung der Differenzen, welche bei der Untersuchung des krystallisierenden Albumins, des Ovalbumins, gefunden worden sind. Sie zeigen übereinstimmend, dafs der Gehalt des „Conalbumins“ an N und S merklich höher ist als des krystallisierten Eiweifses. Da nun andererseits das Mukoid nach den vorliegenden Analysen von Mörner und meinen eigenen Erfahrungen weniger Kohlenstoff (etwa 49 Proz.) und auch weniger Stickstoff (etwa 12,5 Proz.), aber weit mehr Schwefel (etwa 2,25 Proz.) enthält, so mufs die Zusammensetzung des Ovalbumins sich merklich anders ergeben, wenn diese Stoffe

nicht durch Umkrystallisieren entfernt sind. Namentlich gilt für den Schwefelgehalt des Ovalbumins, über den sich bereits eine ganze Diskussion entwickelt hat, dafs eine unvollkommene Reinigung durch Umkrystallisieren sicher zu einem zu hohen Schwefelgehalt führen mufs. Im Hinblick auf die Analysenresultate von Hopkins und Pinkus und von Osborne und Campbell an oft umkrystallisiertem Ovalbumin kann aber dieses Moment nicht als das mafsgebende Moment der analytischen Differenzen angesehen werden.

Des Vergleiches wegen stelle ich die wichtigsten einschlägigen Daten mit dem Konalbumin zusammen.

Autor	Präparate	C	H	N	S	(α) D	Bemerkungen
Hammarsten u. Starke	Ovalb. u. Konalb. nicht krystallis.	52,25	6,9	15,29	1,93	— 37,79°	
Bondzynski u. Zoja	Ovalbum. nicht umkrystallis.	52,31	7,08	15,36	1,67	— 25,8° bis 34,2°	Mittel aus 4 Fraktionen
Hopkins	umkrystall. Ovalb.	52,75	7,12	15,43	1,57	— 30,40°	
Osborne u. Campbell	Ovalbum. 6 mal umkrystallis.	52,82	7,03	15,32	1,59	— 29° bis 30°	
Schulz	Ovalb. umkrystall.	52,22	7,44	15,19	1,23	—	
Langstein	Ovalb. 8- u. 10 mal umkrystallis.	52,46	7,19	15,29	1,34	—	
Hofmeister	Ovalbum. 3 mal umkrystallis.	53,28	7,16	15,00	1,09	—	nach der ursprünglich. Methode
Osborne u. Campbell	Konalbumin	52,75	6,93	16,11	1,70	— 36° bis 39°	

Wie man sieht, vermag eine Beimengung von Konalbumin die Unterschiede, die in der Zusammensetzung des krystallisierten Ovalbumins gefunden wurden, nicht zu erklären, wie sich überhaupt eine Beweisführung für die Reinheit des einen oder des anderen Präparates auf Grund der Zusammensetzung als höchst unzuverlässig erweist. Besonders schlagend ist zum Beispiel, dafs Osborne und Campbell die volle Übereinstimmung ihrer für das krystallisierte Ovalbumin gefundenen Zahlen mit den von Hammarsten gefundenen hervorheben, während doch Hammarstens Präparat nach seiner Darstellung etwa zur Hälfte aus Konalbumin bestanden haben dürfte, wie auch aus der von Starke dafür gefundenen spezifischen Drehung (— 37,39° statt — 30°) hervorgeht.

Der Grund der Analysendifferenzen liegt gewifs noch in anderen Momenten, als man sie bisher herangezogen hat. Vor allem ist das Eierklar von vornherein nicht von konstanter Zusammensetzung. So ist, wie mich Prof. Hofmeister aufmerksam macht,

namentlich der Farbstoffgehalt recht wechselnd. Für die Abweichung des von ihm analysierten Präparates liegt direkt die Angabe vor, dafs es einen rötlichen Farbenton besafs, der sich durch Umkrystallisieren (nach dem zuerst geübten Verfahren) nicht beseitigen liefs. Man kann daran denken, dafs der zu hohe Kohlenstoff-, der etwas zu niedrige Stickstoff- und Schwefelgehalt von der Anwesenheit eines kohlenstoffreichen, schwefel- und stickstofffreien Farbstoffes veranlafst war *).

In Bondzynski-Zojas und Osborne-Campbells Präparaten lag noch ein sehr merklicher Phosphorgehalt vor, welcher in meinen Präparaten völlig fehlte, während ich ihn im Mukoid nie vermifste. Es ist fraglich, ob es sich hier um Phosphate oder um organische Phosphorverbindungen gehandelt hat, welche auf die anderen Werte Einfluſs nehmen.

Dafs beim Umkrystallisieren des Ovalbumins die Entfernung von Beimengungen schwerer gelingt als bei vielen anderen krystallisierenden Stoffen, kann niemand wundernehmen, der bedenkt, dafs es sich in diesem Fall um Beimengungen handelt, welche kolloider Natur sind und allen Ausscheidungen zähe anhaften. Ich komme somit ebenso wie Osborne und Campbell zu dem Schlusse, dafs das Eierklar nur ein krystallisierendes Albumin enthält, und halte dafür, dafs die beobachteten analytischen Differenzen durch die Ungleichheit des Ausgangsmaterials und durch die Schwierigkeit, anhaftende kolloide Beimengungen zu entfernen, genügend zu erklären ist.

Im Hinblick darauf, dafs sich bisher alle untersuchten Proteide des Hühnereiweifses als Glykosamin abspaltend erwiesen haben, versuchte ich auch für das Konalbumin diesen Nachweis zu führen. Das von mir zu diesem Zweck angewandte Verfahren unterscheidet sich nicht von jenem, das beim Euglobulin zur Verwendung kam. Doch erwies sich eine der Säurespaltung vorhergehende energische Quellung in Alkali als notwendig, um zur maximalen Ausbeute an Kohlehydrat zu gelangen. Ich erhielt nach

3	stünd.	Spaltung	6,54	Proz.	a.	Glukose	berechnet**)	ungefähr 9 Proz. auf Glykosamin berechnet.
$4^1/_2$	„	„	7,26	„	„	„	„	
$5^1/_2$	„	„	6,93	„	„	„	„	

Die Benzoylverbindung des abgespaltenen Kohlehydrates wurde durch Eigenschaften und eine N-Bestimmung nach Dumas als

*) Es ist ein wesentlicher Vorteil des Verfahrens von Hopkins und Pinkus, dafs dadurch die Beimengung von Farbstoff sicher vermieden wird.

**) Titration nach Fehling und Knapp.

Pentabenzoylglykosamin*) identifiziert. Dieses Resultat zeigt, dafs anscheinend bei der Bildung der Eiweifskörper des Eierklars die Anlagerung eines Glykosamins Regel ist.

Dieser Befund hat ein gewisses biologisches Interesse, auf das Prof. Hofmeister in seinen Vorlesungen hinzuweisen pflegt. Die speziell für das wachsende Säugetier bestimmte Nahrung, die Milch, enthält Zucker reichlich neben Eiweifs — die entsprechende Nahrung des wachsenden Vogels —, das Eierklar anscheinend nur in verschwindend geringen Mengen. Der Unterschied wird aber dadurch mehr als ausgeglichen, dafs die Proteide des Eierklars kohlehydratreich sind, während das Kasein nach allen neuen Untersuchern als frei davon angesehen werden mufs. Das Glykosamin der Eierklarproteide erfüllt anscheinend die Aufgabe, welche bei der Milch dem Milchzucker zufällt.

Litteratur.

Aronstein, Pflügers Archiv 8, 92.

Baumann, Ber. d. deutsch. chem. Ges. Jahrg. XIX.

Béchamp, Compt. rend. 79, 228.

Bondzynski und Zoja, Zeitschr. f. physiol. Chem. 19, 1 bis 18.

Chittenden und Bolton, Studies from the laboratory of physiological chemistry. Yale University 2, 126 bis 155, New Haven 1887.

Corin et Bérard, Travaux du Laboratoire de Léon Frédéricq. Univ. de Liège, Instit. de Physiol. 2, 170; Bull. acad. Belg. 3, 15.

Dillner, H., Malys. J. f. Th. 15, 31 (1885).

Dumas und Cahours, Ann. chim. phys. (3) 6, 408.

Eichholz, The Journal of Physiology 22, 163 (1898 bis 1899).

Fuld und Spiro, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31.

Gautier, Compt. rend. 79, 228.

Hammarsten, Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 273 (1885); Lehrbuch d. physiol. Chem. 1899.

Hewlett, Journ. of physiol. 13, 493 bis 512.

Hofmeister, F., Zeitschr. f. physiol. Chem. 14, 16, 24; Archiv f. experim. Path. 24.

Hoppe-Seyler, Lehrbuch d. physiol. Chem.

Hopkins und Pinkus, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 31, II, 1311 (1898); Journal of physiol. 23, 130 (1898).

Langstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31.

Lewith, Archiv f. experim. Path. und Pharm. 24.

Mörner, Zeitschr. f. phys. Chem. 18.

Müller, Friedrich, Sitzungsber. d. Ges. z. Beförd. d. ges. Naturw. zu Marburg 1896, Nr. 6.

Mulder, Journal f. prakt. Chem. 1848.

Osborne und Campbell, Journal of the Americ. Chem. Society, vol. 21, vol. 22; Report of the Connect. Agricult. Experim. Stat. 1898.

Panormoff, Journal d. russ. phys. chem. Ges. 28, 29, 30, 31.

Pick, E. P., Zeitschr. f. phys. Chem. 24.

Seemann, J., Über die reduz. Subst., welche sich aus Hühnereiweifs abspalten lassen. Inaug.-Diss. Marburg 1898.

*) 0,1214 Subst. gaben 1,934 Proz. N. nach Dumas.

VII.

Über die Funktion der Brunnerschen Drüsen.

Von Dr. **Karl Glaessner** aus Prag.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

1. Einleitung.

Um sich über die Funktion der Brunnerschen Drüsen eine Meinung zu bilden, hat man sich bisher mehr auf anatomisch-histologische als auf experimentell-physiologische Thatsachen gestützt.

Die Lage der Brunnerschen Drüsen im obersten Abschnitt des Dünndarmes, das Übergreifen derselben in den Pylorusteil des Magens, das in dem Vorkommen von Pylorusdrüsen unterhalb des Sphincter ein Gegenstück findet, die grofse Ähnlichkeit, wo nicht Identität ihrer zelligen Elemente mit den Hauptzellen der Pylorusdrüsen erklären genügend, dafs man in ihnen eine Fortsetzung des Drüsenstratums des Pylorus gesehen hat. So hält einer der jüngsten Untersucher, Schiefferdecker[1]), dafür, dafs die Brunnerschen Drüsen eine durch das Hinzukommen der Lieberkühnschen Drüsen etwas in die Tiefe, in den Bereich der Submucosa gerückte Fortsetzung der Pylorusdrüsenregion sei, und weist nach, dafs dort, wo die Brunnerschen Drüsen ausmünden, Magenepithel, dort, wo die Lieberkühnschen Drüsen ihre Ausmündung haben, dagegen Darmepithel vorhanden sei.

Es liegt nahe, aus dieser morphologischen Verwandtschaft auf Ähnlichkeit der physiologischen Leistung zu schliefsen. Dieser Schlufs wird noch gestützt durch den von Hirt[2]) und Heidenhain[3]) geführten Nachweis, dafs die Zellen der Brunnerschen Drüsen bei der Verdauung ähnliche Veränderungen aufweisen wie die der Pylorusdrüsen. Im Hungerzustande sind sie verhältnismäfsig grofs und hell, im Verdauungszustande klein und getrübt

Eine maſsgebende Bedeutung kann man allerdings dieser Analogie nicht zuerkennen, da das morphologische Verhalten einer Drüsenzelle einen Schluſs auf die Art ihres Sekretes erfahrungsgemäſs nicht gestattet.

Auch das vergleichend-anatomische Verhalten der Brunnerschen Drüsen giebt über ihre Funktion keinen Aufschluſs.

Middeldorpf[4]) stellte u. a. die Thatsache fest, daſs die Brunnerschen Drüsen nur den Säugetieren zukommen, den Vögeln, Reptilien und Fischen dagegen fehlen. Nach seinen, Schwalbes[5]) und Kuczinskys[6]) Angaben ist übrigens diese Verbreitung bei den Säugetieren eine sehr ungleiche. Beim Fleischfresser und den Nagern bilden sie nur eine schmale, unter dem Pylorus gelegene Zone, bei den Wiederkäuern, Einhufern und beim Schweine erstreckt sich aber ihr Verbreitungsgebiet weiter darmabwärts — so beim Schweine bis 4 m, beim Pferde bis 7 m unterhalb des Pylorus. Diese Befunde müssen die Vermutung nahelegen, daſs das Sekret der Brunnerschen Drüsen seine Wirksamkeit auch bei Gegenwart von alkalischem Darminhalte: Pankreassekret, Galle und Darmsaft, ausüben könne, was sich aber bei Festhalten der gangbaren Anschauungen schlecht mit der Vorstellung verträgt, daſs dieses Sekret demjenigen des Pylorusteiles entspricht. Nach gewöhnlicher Annahme soll es nämlich ein dem Funduspepsin entsprechendes Ferment enthalten, welches aber bekanntlich bei alkalischer Reaktion und Gegenwart von Trypsin rasch seine Wirksamkeit einbüſst.

Auch die wenigen experimentellen Erfahrungen, die man über die Funktion der Brunnerschen Drüsen gesammelt hat, sind reich an Widersprüchen.

Die ersten Beschreiber, Wepfer[7]) und Brunner[8]), nannten sie: Pancreas secundarium, da sie bei ihnen eine ähnliche Funktion, wie sie dem Pankreas zukommt, vermuteten. Middeldorpf[4]) wandte sich gegen diese Anschauung, ebenso Böhm[9]) und Claude Bernard[10]), die sämtlich die Verschiedenheit zwischen dem Sekrete des Pankreas und des Duodenums hervorhoben. Schiff[11]) glaubte die Funktion der Brunnerschen Drüsen in dem Unwirksamwerden des Pepsins suchen zu sollen, da er sah, daſs Magensaft, zusammengebracht mit dem Sekrete des Duodenums, in seiner Wirkung sehr geschädigt wurde. Aus den Versuchen von Budge und Krolow[12]) ergab sich, daſs der Auszug der Brunnerschen Drüsen Stärke in Zucker verwandle, was schon Middeldorpf gesehen hatte, daſs er ferner in saurer Lösung Fibrin, nicht aber

koaguliertes Eiweifs bei 35° zu lösen vermag, während er sich Fetten gegenüber vollständig indifferent verhält. Costa [13]) versuchte die Brunnerschen Drüsen beim Pferde durch Ausschneiden aus der Submucosa von den Lieberkühnschen Drüsen zu trennen. Es ergab sich, dafs der Auszug aus den Lieberkühnschen Drüsen sowohl als aus den Brunnerschen Drüsen Stärke in Zucker zu verwandeln vermochte, dafs aber Brunnersche Drüsen und Lieberkühnsche Drüsen auf Fett und Eiweifsstoffe ohne Wirkung waren.

Grützner [14]) vermochte hingegen aus den Brunnerschen Drüsen mit Salzsäure von 0,1 Proz. und mit Glycerin Auszüge zu bereiten, welche Fibrin in salzsaurer Lösung rasch lösten. Diese Wirkung liefs sich direkt unter dem Mikroskop an Schnitten beobachten. Grützner erklärt daraufhin die Brunnerschen Drüsen für pepsinbereitende Organe, analog den Pylorusdrüsen, die danach nicht ein „Pancreas secundarium", sondern ein „Pylorus secundarius" genannt zu werden verdienten. Er hält aber ihre Bedeutung als Pepsinbildner nicht für hervorragend: „Inwieweit sie freilich in den Akt der Verdauung eingreifen, das läfst sich zur Stunde noch nicht mit Genauigkeit angeben; denn wie soll ihr gewifs in geringen Mengen abgesondertes pepsinhaltiges Sekret noch zur Wirkung gelangen, wenn der alkalische Darm- und Pankreassaft und die alkalische Galle in Massen sich mit demselben vermischen?"

In neuester Zeit wiesen Gachet und Pachon [15]) die eiweifslösende Kraft des Duodenalsekretes nach, indem sie nach Unterbindung der Pankreasgänge und Einführung von Eiweifscylindern in das oben und unten verschlossene Duodenum Verdauung des Eiweifses sicherstellten.

Die auffallenden Widersprüche, welche sich in diesen nicht allzu zahlreichen Untersuchungen finden, mögen schuld tragen, dafs auch die neueren Lehrbücher der Physiologie von der Funktion der Brunnerschen Drüsen fast nichts zu sagen wissen. Um so näher mufste es mir liegen, die Methodik, welche sich bei Untersuchung der Profermente und Fermente der Magenschleimhaut [16]) bewährt hatte, auf die Untersuchung der Brunnerschen Drüsen zu übertragen.

2. Methodisches.

Die Hauptschwierigkeiten einer physiologischen Untersuchung der Brunnerschen Drüsen ergeben sich daraus: 1. dafs sich die-

selben nur schwer von den darüber gelegenen Lieberkühnschen Drüsen trennen lassen; 2. dafs die Duodenalfläche während der Verdauung vom Mageninhalt andauernd bespült wird, somit reichlich Gelegenheit hat, aus ihm Pepsin durch Adsorption aufzunehmen; 3. ist aber auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dafs Pankreassekret zeitweilig bis in den obersten Duodenalabschnitt hinaufgelangt, und somit auch seine Fermente, vornehmlich Trypsin, gelegentlich bei Untersuchung der Duodenalschleimhaut angetroffen werden.

Dieser Schwierigkeiten habe ich bei verschiedenen Versuchen in folgender Weise Herr zu werden versucht. Um einer Täuschung durch Fermente der Lieberkühnschen Drüsen vorzubeugen, entfernte ich dieselben nach Thunlichkeit durch Abschaben mit dem Skalpell und sterilisierte überdies die Oberfläche durch kochendes Wasser. Dabei mufste auch etwa noch oberflächlich anhaftendes Pepsin und Trypsin zerstört werden. Überdies wurden die so erhaltenen Schleimhautreste einer anhaltenden Digestion mit schwach alkalischer Sodalösung bei Brutwärme ausgesetzt, was nach dem in einer früheren Arbeit Mitgeteilten die sichere Abtötung von anhaftendem Pepsin zur Folge haben mufste.

Um einen etwaigen störenden Einflufs der Reste der Lieberkühnschen Drüsen nicht zu übersehen, untersuchte ich dieselben, inwiefern sich Fermente in diesen bei gleicher Behandlung nachweisen lassen, und zwar sowohl an der intakten Duodenalschleimhaut wie auch an der Darmschleimhaut, wo die Brunnerschen Drüsen fehlen. Geprüft wurde auf peptisches, tryptisches und diastatisches, invertierendes und fettspaltendes Ferment. Als Material wurden Duodena vom Schweine und Hunde, als den Repräsentanten der Tierspezies mit reichlicher und spärlicher Entwickelung der Brunnerschen Drüsen, genommen. Das Duodenum wurde sorgfältig vom Inhalte befreit, die Muscularis nach Möglichkeit entfernt. Dann wurde der Darm zwölf Stunden in fliefsendem Wasser gewaschen, nach dieser Zeit in kochendes Wasser geworfen und zwei Minuten daselbst belassen, dann in sterilem Wasser abgekühlt, die Schleimhaut nach Möglichkeit mit dem Skalpell entfernt, das Darmstück nochmals für eine Minute in kochendes Wasser geworfen und dann weiter verarbeitet. Die weiteren Manipulationen bestanden im Zerkleinern des Darmteiles mittels der Fleischhackmaschine und Versetzen mit der doppelten Gewichtsmenge mit Soda schwach alkalisch gemachten Wassers, dem Toluol zugefügt wurde. Das so gewonnene Gemenge wurde mehrere Tage bei 40° C. im

Sandbade sich selbst überlassen (a). Zu gleicher Zeit wurden genau so behandelte Duodena bei neutraler (b) und schwach saurer Reaction (c) der Autolyse überlassen (Versuchsreihe I).

Eine zweite Versuchsreihe war genau so angeordnet, nur wurde statt Toluol Chloroform als Antisepticum verwendet.

Die dritte Versuchsreihe wurde mit Duodena angestellt, bei denen die Zerstörung der Lieberkühnschen Drüsen unterblieben war.

Die vierte Versuchsreihe endlich betraf unterhalb des Verbreitungsbezirkes der Brunnerschen Drüsen liegende Darmschleimhaut, die sonach nur Lieberkühn'sche Drüsen aufwies.

3. Versuche.

Ich lasse nun die Ergebnisse der vier Versuchsreihen folgen und erwähne nur, dafs dieselben sowohl für das Schwein als auch für den Hund Gültigkeit haben.

Versuchsreihe I (Schleimhaut des Duodenums abgebrüht und abgeschabt). Dauer der Autolyse: 14 Tage unter Toluol.

Reaktion	a) schwach alkalisch	b) neutral	c) schwach sauer
Fibrin	wird langsam verdaut	wird langsam verdaut	wird verdaut
Serumeiweifs . . .			
koagul. Eieralbumin			
Stärke	wird nicht verzuckert	wird nicht verzuckert	wird nicht verzuckert
Rohrzucker	wird nicht invertiert	wird nicht invertiert	wird nicht invertiert
Fett	wird nicht emulgiert	wird nicht emulgiert	wird nicht emulgiert

Dieser Versuch ergiebt, dafs der Auszug der Brunnerschen Drüsen verdauend wirkt, und zwar am besten in schwach saurer Lösung. Wurde zu dem alkalischen oder neutralen Extrakt Säure hinzugefügt, so verdaute es bedeutend besser. Stärke, Rohrzucker und Fett wurden nicht angegriffen.

Versuchsreihe II (Schleimhaut des Duodenums abgebrüht und abgeschabt). Dauer der Autodigestion: 14 Tage unter Chloroform.

Das Ergebnis war in betreff der Wirkung auf Eiweifs und Fett dasselbe wie oben; auf diastatisches und invertierendes Ferment wurde wegen Gegenwart von Chloroform nicht geprüft.

Versuchsreihe III (Schleimhaut des Duodenums erhalten). Dauer der Autodigestion: 14 Tage unter Toluol.

Reaktion	a) schwach alkalisch	b) neutral	c) schwach sauer
Fibrin	wird	wird	wird
Serumeiweifs . . .	langsam	langsam	verdaut
koagul. Eieralbumin	verdaut	verdaut	
Stärke	wird	wird	wird
	verzuckert	verzuckert	nicht verzuckert
Rohrzucker	wird	wird	wird
	nicht invertiert	nicht invertiert	nicht invertiert
Fett	wird	wird	wird
	nicht emulgiert	nicht emulgiert	nicht emulgiert

Diese Versuchsreihe zeigt, dafs die Lieberkühnschen Drüsen ein diastatisches Ferment produzieren, das nach längerer Zeit aus Stärke Zucker bildet. Dieses diastatische Ferment ist nur in alkalischen und neutralen, nicht aber in sauren Auszügen enthalten, während das peptische Ferment in allen drei Auszügen vorkommt und sogar durch Ansäuern aus dem alkalischen Auszuge in gröfserer Ausbeute gewonnen werden kann.

Versuchsreihe IV (Schleimhaut intakt, untere, keine Brunnerschen Drüsen enthaltende Dünndarmpartieen). Dauer der Autodigestion: 14 Tage unter Toluol.

Reaktion	a) schwach alkalisch	b) neutral	c) schwach sauer
Fibrin	wird	wird	wird
Serumeiweifs . . .	nicht verdaut	nicht verdaut	nicht verdaut
koagul. Eiereiweifs			
Stärke	wird	wird	wird
	verzuckert	verzuckert	verzuckert
Rohrzucker	wird	wird	wird
	nicht invertiert	nicht invertiert	nicht invertiert
Fett	wird	wird	wird
	nicht emulgiert	nicht emulgiert	nicht emulgiert

Aus dem Vergleich der dritten und vierten Versuchsreihe geht hervor, dafs das peptische Ferment nur den Brunnerschen, das diastatische nur den Lieberkühnschen Drüsen zukommt.

4. Das proteolytische Ferment der Brunnerschen Drüsen.

In Bestätigung der Angaben von Budge und Krolow und von Grützner zeigen obige Versuche, dafs die Brunnerschen

Drüsen ein in saurer Lösung eiweifsverdauendes Ferment enthalten. Aber schon der Umstand, dafs diese Wirkung auch bei neutraler und schwach alkalischer Reaktion eintritt, lehrt, dafs es sich nicht um das gewöhnliche Pepsin handeln kann — es wäre denn, dafs man daneben ein zweites trypsinähnliches Ferment annehmen wollte.

Ich habe zur Klarstellung dieser Verhältnisse in ähnlicher Weise wie bei den Fermenten des Magens [17]) die Eigenschaften des vorliegenden Fermentes festzustellen versucht und dabei folgendes ermittelt: 1. Das proteolytische Ferment der Brunnerschen Drüsen wirkt bei schwach saurer (0·2 bis 0·3 Proz. HCl), aber auch bei schwach alkalischer (0·5 proz. Na_2CO_3) und neutraler Reaktion; 2. Es führt in kurzer Zeit zur Bildung von Tryptophan, und zwar sowohl bei saurer, als bei alkalischer Reaktion; 3. Es läfst sich nicht durch die Uranylacetatmethode [17]) aus den Infusen gewinnen, sondern geht dabei verloren.

Diese drei Punkte unterscheiden das proteolytische Ferment der Brunnerschen Drüsen vom echten Pepsin, die Thatsache, dafs es auch bei saurer Reaktion (in der Stärke der Magensalzsäure) wirksam bleibt, vom Trypsin. Das vorliegende Ferment zeigt somit das gleiche Verhalten, wie das von mir [17]) beschriebene „Pseudopepsin" des Magens, speciell des Pylorus.

Soweit bei Fermenten, die ja vorläufig nur durch ihre Wirksamkeit charakterisiert sind, von Identität gesprochen werden kann, ist es mit ihm identisch. Der von den Histologen hervorgehobenen und auch von Grützner betonten Verwandtschaft der Brunnerschen und der Pylorusdrüsen entspricht sonach auch physiologische Gleichartigkeit.

Auffallend ist endlich die Analogie zwischen der Funktion der Brunnerschen Drüsen und der Pylorusanhänge vieler Fische. Krukenberg [18]), Blanchard [19]) und Stirling [20]), die sich in neuerer Zeit mit diesen interessanten Gebilden befafst haben, fanden wiederholt in denselben sowohl tryptisches als peptisches Ferment, d. h. ein bei saurer und alkalischer Reaktion wirksames verdauendes Enzym, das mit dem „Pseudopepsin" identisch zu sein scheint.

Der Frage, ob dieses „Pseudopepsin" in den Zellen der Brunnerschen Drüsen in Form einer Vorstufe vorhanden ist, habe ich nicht besondere Versuche gewidmet. Da das Pseudopepsin schon bei der Reaktion der Gewebe, ähnlich dem Trypsin, verdauend wirkt, ist es in den Drüsenzellen sicher nicht einfach gelöst enthalten. Die Thatsache, dafs es gelingt, die Wirksamkeit der neutralen oder schwach alkalischen Auszüge durch Säurebehandlung zu erhöhen, spricht für die Existenz eines Proferments.

Wenn Grützner und andere seiner Zeit Bedenken trugen, die physiologische Bedeutung der Brunnerschen Drüsen in ihrer peptischen Wirkung zu sehen, weil ja diese Wirkung im Hinblick auf die alkalische Reaktion des Dünndarminhaltes eine höchst vorübergehende sein müfste, so dürfte dieses Bedenken jetzt hinfällig geworden sein.

Denn einerseits weifs man jetzt, dafs im Darme keineswegs regelmäfsig alkalische, sondern oft genug bis tief herab schwach saure Reaktion besteht, andererseits zeigen meine Befunde, dafs die verdauende Wirkung des Pseudopepsins durch den Wechsel der Reaktion nicht aufgehoben wird. Für den Fall, dafs das Trypsin fehlt oder wegen zu stark saurer Reaktion nicht zur Wirkung gelangt, kann es durch Pseudopepsin als ein in gleichem Sinne spaltend wirkendes Agens ersetzt werden. Für den Fleischfresser, wo die Verflüssigung des eingeführten Eiweifses sich in der Norm nahezu ganz im Magen vollzieht, wäre das von geringerer Bedeutung; hier ist ja auch die Verbreitung der Brunnerschen Drüsen eine äufserst beschränkte. Anders aber beim Pflanzenfresser, wo die schwer aufschliefsbare Nahrung vielfach erst im Darme ihr Eiweifs abgiebt, und wo daher die Existenz eines in seiner Wirkung von der gerade herrschenden Reaktion unabhängigen Fermentes unter Umständen von grofser Wichtigkeit sein mag. Jedenfalls ist bemerkenswert, dafs das proteolytische Ferment des Pylorus und der Brunnerschen Drüsen gewisse Eigenschaften beider in gleicher Richtung wirksamen Nachbarfermente, des Pepsins und des Trypsins, vereinigt.

Litteratur.

[1]) Schiefferdecker: „Beiträge zur Kenntnis der Drüsen des Darmes und Duodenum." Nachr. d. Götting. Gesellsch. d. Wissensch. 7 (1884).

[2]) Hirt, siehe Heidenhain: „Bemerkungen über die Brunnerschen Drüsen." Arch. f. m. Anat. 8 (1872).

[3]) Heidenhain: „Bemerkungen über die Brunnerschen Drüsen." Arch. f. mikr. Anatomie 8 (1872).

[4]) Middeldorpf: „Disquisitio de glandulis Brunianis." Vratislaviae 1846.

[5]) Schwalbe: „Beitrag zur Kenntnis der Drüsen in den Darmwandungen, insbesondere der Brunnerschen Drüsen." Archiv. f. mikroskop. Anatomie 8 (1872).

[6]) Kuczinsky: „Beitrag zur Histologie der Brunnerschen Drüsen." Internat. Monatsschr. f. Anat. u. Physiologie 7, 11, S. 419.

[7]) Wepfer, vergl. Oppel: „Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Wirbeltiere", 2 (1897).

[8]) Brunner: „De glandulis in intestino hominum detectis." Heidelberg 1688.

[9]) Böhm: „De glandularum intestinalium structura penitiori." Dissertation, Berlin 1835.

[10]) Cl. Bernard: „Mémoire sur le pancréas." Suppl. aux compt. rend. de l'acad. des sciences, t. 1 (1835).

[11]) Schiff: „Bericht über einige Versuchsreihen." Pflügers Archiv f. d. ges. Physiologie 3, 588.

[12]) Budge und Krolow: „Berliner klin. Wochenschrift 1870", Nr. 1.

[13]) Costa: „Über die Funktion der Drüsen der Darmschleimhaut." Gazz. med. veter. II. Jahrg.

[14]) Grützner: „Notizen über einige ungeformte Fermente im Säugetierorganismus." Pflügers Arch. f. d. ges. Phys. 12 (1872).

[15]) Gachet et Pachon: „De la digestion de l'albumine par le duodénum." Arch. de physiol. norm. et patholog. 1898, p. 322.

[16]) K. Glaessner: „Über die Profermente der Magenschleimhaut." Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie 1 (1901).

[17]) Derselbe: „Über die örtliche Verteilung der Profermente in der Magenschleimhaut." Ebendaselbst.

[18]) Krukenberg: „Versuche zur vergleichenden Physiologie der Verdauung, mit besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse bei den Fischen." Untersuchungen des physiologischen Instituts der Universität Heidelberg 1, 327 (1877/78).

[19]) Blanchard: „Sur les fonctions des appendices pyloriques." Extr. du Bulletin de la société zoologique de France, t. 8 (1883).

[20]) Stirling: „On the ferments or enzymes of the digestive Tract in fishes." Journal of Anatomy and physiology, vol. 18, 426 (1884).

VIII.

Das Verhalten des Fettes bei der Autolyse der Leber.

(Ein Beitrag zur Theorie der fettigen Degeneration.)

Von Dr. F. Siegert, Privatdozent der Kinderheilkunde in Strafsburg.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

1.

Aseptisch entnommene und bei Brutwärme gehaltene Organe zeigen makroskopische und mikroskopische Veränderungen, welche manche Ähnlichkeit mit der „fettigen Degeneration" der Organe bieten. In zunehmendem Grade treten in den Zellen helle, transparente Flecken und Tropfen auf, welche sich mit Osmiumsäure schwärzen; durch Zusammenfliefsen einzelner, zunächst einer feinen Bestäubung ähnlicher Pünktchen und durch Anwachsen derselben entstehen Tropfen, welche einzeln oder in gröfserer Zahl die Zelle ausfüllen, deren Kern zugleich sein Verhalten gegen die Kernfarben verändert. Hauser*) und nach ihm Kraus**) haben sich eingehend darüber ausgesprochen.

Auch die Leukocyten des überlebenden oder aseptisch conservierten Blutes zeigen nach von Recklinghausens***) und Zahns†) Untersuchungen das Auftreten derartiger „Fetttröpfchen". Von Recklinghausen, Zahn und Hauser untersuchten nur das histologische Verhalten der Zelle bei dieser Form von „fettiger Degeneration", Kraus weiter auch die Frage des chemischen Verhaltens der „fettig degenerierten" Organteile. Er konnte bei zwei- bis vierwöchentlicher Digestion der Leber und Niere von Kaninchen bei Brutwärme keine Vermehrung des Ätherextrakts finden und

*) Hauser, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 20, 162.

**) Kraus, daselbst 22.

***) v. Recklinghausen, Handb. d. allg. Pathol. 387.

†) Zahn, Virchows Arch. 95.

schliefst daraus, dafs eine Neubildung von Fett während der Versuchsdauer nicht stattgefunden habe. Dem gegenüber kam Kotsowski*) zum entgegengesetzten Resultat. Er bestimmte das Ätherextrakt von Kaninchenleber vor und nach der aseptischen Konservierung und fand bei Extraktion von allerdings nur 1,58 bis 8,69 g Lebersubstanz eine befremdend hohe Steigerung, von 8 bis 10 Proz. im frischen auf 15 bis 20 Proz. im konservierten Organe. Auch die von W. Lindemann**) jüngster Zeit mitgeteilten Analysen von „fettig degeneriertem" Herzmuskel beweisen keine Zunahme an echtem Fett, sondern allenfalls eine Vermehrung des Ätherextrakts durch ätherlösliche Stoffe, welche sich in betreff der Säurezahl, Jodzahl und Reichert-Meiselschen Zahl sehr auffallend von dem normalen Herzfett unterscheiden.

In Anbetracht der sich widersprechenden Ergebnisse von Kraus und Kotsowski, welchem letzteren Lindemann eine entscheidende Bedeutung beilegt, ferner in Anbetracht des Umstandes, dafs die Autoren nur das Ätherextrakt als Ganzes berücksichtigt haben, war es wünschenswert, diese Versuche unter Verwendung gröfserer Organstücke zu wiederholen und dabei vor allem die eigentlichen Fette bezw. die hohen Fettsäuren selbst zu bestimmen. Denn die „fettige Degeneration" der pathologischen Anatomen kann nur Bezug haben auf die Bildung wasserunlöslicher Fette oder Fettsäuren, nicht aber auf Bildung der niedersten Fettsäuren, welche als solche und in ihren Glyceriden noch mehr oder weniger wasserlöslich sind, ebenso wenig auf Milchsäure und andere Oxysäuren, welche, obgleich ätherlöslich, doch an dem histologischen Bilde der „fettigen Degeneration" sicher keinen Anteil nehmen. Der Nachweis echter Fettbildung mufs also hinauslaufen auf einen Nachweis der Entstehung hoher Fettsäuren, nicht etwa blofs einer Zunahme des Ätherextrakts.

Auch bei der Frage der Fettbildung aus Eiweifs begegnet uns dasselbe Problem. Die Bildung von niederen, flüchtigen, in Wasser mehr oder weniger löslichen Fettsäuren — bis zur Capronsäure — aus dem Eiweifs ist analog den entsprechenden Befunden bei der Eiweifsfäulnis sehr wohl verständlich und erscheint seit dem Befunde von Jacoby, dafs bei der Autolyse der Leber festgebundenes NH_2 als NH_3 abgespalten wird, falls gleichzeitig eine Reduktion stattfindet (z. B. $C_6H_{13}NO_2 - NH_3 + H_2 = C_6H_{12}O_2$), auch für den lebenden Organismus im Bereich der Möglichkeit.

*) Kotsowski, Arch. d. sciences biolog. St. Pétersbourg 4.

**) Lindemann, Zieglers Beitr. z. path. Anat. 25, 392a; Zeitschr. f. Biol. 38, 405.

2. Methodik.

Vorgebildet finden sich in der Leber nach Noël Paton*): Fett, Fettsäuren, Lecithin, Jecorin und das „Lecithinalbumin". Letzteres würde also — wie die etwa bei der Autolyse durch Fettspaltung sich vermehrenden Ammoniak- oder Kalkseifen — der Ätherextraktion entgehen, wenn nicht die vorausgehende Behandlung des sauren Leberbreies mit siedendem Alkohol die nachträgliche Extraktion mit Äther ermöglichte.

Aufgabe der Methode ist, wie wir gesehen haben, zu erfahren, ob die hohen Fettsäuren bei der Autolyse der Organe eine Vermehrung erfahren. Bei der Ermittelung derselben ist ein kleiner Fehler insofern möglich, als bei dem Trocknen des Ätherextrakts durch Oxydation der ungesättigten Ölsäure flüchtige Produkte entstehen. Schon beim Stehen an der Luft wird letztere bekanntlich leicht ranzig und es bilden sich Oxysäuren der Fettsäurereihe (Oxyölsäuren u. s. w.) und durch Spaltung Fettsäuren mit niedrigem Kohlenstoffgehalt (Ameisensäure, Essigsäure, Buttersäure u. s. w.). Doch fällt dieser an sich sehr geringe Fehler nicht ins Gewicht, da er in gleichem Maſse den Kontrollversuchen anhaftet. Die etwa von vornherein vorhandenen flüchtigen Fettsäuren verdunsten beim Trocknen des Ätherextrakts, wie die Geruchlosigkeit der erhaltenen Fettsäuren gegenüber dem ursprünglichen Ätherextrakt zeigt.

Abgesehen von diesen verschwindend geringen Fehlern ergaben sich leicht Verlust bringende technische Schwierigkeiten, welche nur bei sorgfältigem Arbeiten bewältigt werden können.

Auf Grund nicht weiter auszuführender Vorversuche hat sich mir nachstehende Methodik als zweckmäſsig bewährt.

Zur aseptischen Autolyse gröſserer Leberstücke benutzte ich ein von Conradi in Forsters Laboratorium ausgearbeitetes Verfahren, über welches dieser im nächsten Hefte dieser Beiträge Genaueres mitteilen wird. Dem Hund, der nach ein- bis zweitägigem Fasten entblutet wurde, werden möglichst schnell und aseptisch gröſsere Leberteile entnommen und diese behufs Abtötung von Keimen an der Oberfläche mit siedendem Wasser, event. noch Sublimatlösung behandelt, dann in groſser steriler Schale mit tief übergreifendem Deckel bei cirka 37,5° im feucht gehaltenen Brutschrank belassen. Eine nachträgliche bakteriologische Kontrolle der erzielten Asepsis ist selbstverständlich. Etwa erfolgte Infektion verrät sich übrigens fast stets dem Auge oder der Nase.

*) Noël Paton, Journ. of Physiology 19, 3, 167.

Zur Extraktion werden die nach der Autolyse stets sauer reagierenden Organteile zerkleinert mit mehrfach gewechseltem Alkohol in steigender Konzentration bei cirka 40° C. wochenlang zur Ätherextraktion vorbereitet. Die nach dem Abdampfen des Alkohols erhaltenen Rückstände werden behufs Ätherextraktion mit dem Ausgangsmaterial vereinigt. Dasselbe wird vorher auf dem Wasserbade getrocknet und fein pulverisiert, nachdem eine zwei- bis dreitägige Ätherextraktion bei Zimmertemperatur vorausgegangen ist. Beendet wird die Extraktion durch etwa 14tägiges Ausziehen mit mehrfach gewechseltem alkoholfreien Äther. Doch pflegt beim Wechseln desselben schon nach höchstens acht Tagen so gut wie kein Fett mehr in diesen überzugehen. Der Äther wird verjagt, die Substanz mit absolutem Alkohol zum Sieden erhitzt, der Alkohol abgedampft und durch Erhitzen mit verdünnter Salzsäure etwa der Extraktion entgangene Seife gespalten und nach dem Erkalten mit dem Glasstabe die ganz unbedeutende Menge noch vorhandener fester Fettsäuren gesammelt, um dem Ätherextrakt beigefügt zu werden. Der Rückstand wird nun von etwa ihm anhaftendem Wasser durch öfteres Zufügen von etwas absolutem Alkohol und Abdampfen befreit und in Äther gelöst. Durch Zusatz von absolutem Alkohol tritt dann bei dem Extrakt der frischen Leber ein flockiger Niederschlag jecorinartiger Substanzen auf, der im Extrakt der autolysierten Leber vollständig fehlt.

Bei Hund IV wurde das Extrakt der frischen wie autolysierten Leber durch Schütteln der ätherischen Lösung mit destilliertem Wasser noch von den wasserlöslichen Teilen befreit, und nach sorgfältigem Trocknen die Extraktmenge verglichen.

Um Verluste zu vermeiden, thut man gut, den Äther aus dem Wägegläschen erst bei Zimmertemperatur, dann ein bis zwei Tage bei 40 bis 45° C. und schliefslich eine bis zwei Stunden bei cirka 98° verdunsten zu lassen, dann erst endgültig im Vakuum über Schwefelsäure zu trocknen.

Zur Bestimmung der gesamten hohen, nicht flüchtigen oder wasserlöslichen Fettsäuren wird eine gewogene Menge des Ätherextrakts mit Alkohol-Äther gelöst und mit starker wässeriger Kalilauge am Rückflufskühler etwa zwei Stunden erhitzt. Alkohol und Äther werden weggekocht, was cirka dreiviertel Stunden dauert, dann die Seife in viel siedendem Wasser gelöst und mit Salzsäure oder Schwefelsäure im Überschufs gespalten.

24 Stunden dauerndes Verweilen auf dem Wasserbade, event. noch längeres, bewirkt scharfe Trennung der Fettsäuren, welche als tiefbraunrote Fettaugen über dem gelbbraunen, durchaus klaren Wasser schwimmen, und welche durch sechs- bis achtmaliges Absaugen des Waschwassers und gutes Schütteln mit dem neuen Waschwasser leicht fast neutral werden. Läfst man die stark durchgeschüttelten Fettsäuren jedesmal 6 bis 12 Stunden sich von dem Waschwasser auf dem Wasserbade absetzen, so geht dies stets klar durch ein gewöhnliches Faltenfilter, während auch bei gehärteten, dichtesten Filtern, aber noch trübem Waschwasser Verluste nicht zu vermeiden sind.

Schliefslich werden die Fettsäuren auf dem nassen Filter noch

gewaschen, bis das Waschwasser neutrale Reaktion zeigt, von dem durch kaltes Wasser rasch abgekühlten Filter mühelos entfernt, über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet, dann mit Äther aufgenommen, filtriert und ins Wägegläschen gebracht. Sollten noch Wassertröpfchen den Fettsäuren beigemengt sein, so werden sie, wie oben angegeben, durch Hinzufügen von absolutem Alkohol und Abdampfen u. s. w. getrocknet und gewogen.

3. Versuche und Versuchsergebnis.

Hund I*).

A. Frische Leber. 94,5 g. Die Leber ergiebt 4,784 Proz. Ätherextrakt und liefert 2,21 Proz. hohe Fettsäuren.

B. Autolysierte Leber, 9 Tage nach der Entnahme. Steril. 36,73 g.

Ätherextrakt giebt keine Alkoholfällung, ist weniger zähe als der des frischen Organs.

Ätherextrakt = 4,69 Proz.

Hohe Fettsäuren = 2,27 Proz.

Hund II.

A. Frische Leber. 241 g liefern 4,47 Proz. Ätherextrakt resp. 2,98 Proz. hohe Fettsäuren.

B. Autolysierte sterile Leber (7 Tage). 108 g liefern 4,45 Proz. Ätherextrakt resp. 3,05 Proz. hohe Fettsäuren.

Hund III.

A. Frische Leber. 190 g geben 5,84 Proz. Ätherextrakt resp. 2,85 Proz. hohe Fettsäuren.

B. Sterile Leber (62,1 g) giebt 5,795 Proz. Ätherextrakt resp. 2,86 Proz. hohe Fettsäuren.

C. Nicht ganz sterile Leber (72,2 g) giebt 5,735 Proz. Ätherextrakt resp. 2,83 Proz. hohe Fettsäuren.

Hund IV (sehr grofses abgemagertes Tier).

A. Frische Leber (300 g) giebt ein von dem wasserlöslichen Anteil, wie von dem „Jecorin“ befreites

*) Bei Hund I bis III enthält das Ätherextrakt die wasserlöslichen Bestandteile, ist aber frei von der alkoholfällbaren Substanz. Die mitgeteilten Prozentwerte sind das Mittel von gut stimmenden Doppel- und mehrfachen Analysen.

Ätherextrakt zu 3,256 Proz. resp. 1,82 Proz. hohe Fettsäuren.

B. Sterile Leber (365 g), ebenso behandelt, giebt 3,303 Proz. Ätherextrakt resp. 1,85 Proz. hohe Fettsäuren.

Die vier Versuche ergeben somit:

	Ätherextrakt		Hohe Fettsäuren	
	Frische Leber Proz.	Autolysierte Leber Proz.	Frische Leber Proz.	Autolysierte Leber Proz.
Hund I	4,784	4,69	2,21	2,27
Hund II	4,47	4,45	2,98	3,05
Hund III	5,84	5,795	2,85	2,86
Hund IV	3,256	3,303	1,82	1,85

Die Ergebnisse bestätigen zunächst die Resultate von Kraus; sie zeigen, dafs eine nennenswerte Vermehrung des Ätherextrakts bei der Autolyse nicht erfolgt. Sie zeigen aber weiter, dafs auch die hohen Fettsäuren eine Vermehrung nicht erfahren.

Trotzdem sonach nun das Lebergewebe bei der aseptischen Autolyse eine Veränderung erfährt, welche mikroskopisch wie makroskopisch der „fettigen Degeneration“ vergleichbar ist und mikroskopisch schon nach wenigen Tagen bei Osmiumfärbung fast ganz aus den sich schwarz färbenden Tropfen besteht, wie sie von Morphologen immer wieder als „Fett“ bezeichnet werden, ergiebt sich der Abgang jeder entsprechenden chemischen Veränderung.

Nun könnte man einwenden, dafs eine Fettvermehrung zwar stattfindet, aber vielleicht durch eine nebenher erfolgende Fettzerstörung verdeckt werde. Doch ist eine solche Annahme ganz unwahrscheinlich im Hinblick darauf, dafs Kraus' und meine Versuche sich auf verschiedene Tierarten und Organe bei ganz verschiedener Dauer der Autolyse beziehen. Unter so verschiedenen Bedingungen ist nicht zu erwarten, dafs Fettbildung und Zerstörung sich gerade genau die Wage halten.

Wohl aber scheint der in das Ätherextrakt übergehende Leberbestandteil bei der Autolyse eine teilweise qualitative Veränderung zu erfahren. Die zähe Konsistenz des Ätherextrakts der frischen Leber vor der Fällung des „Jecorins“ mit absolutem Alkohol gegenüber der mehr weichen Beschaffenheit des Ätherextrakts der autolysierten Leber wies auf das Fehlen des „Jecorins“ in deren

Ätherextrakt hin. In der frischen Hundeleber betrug seine Menge bei meinen Versuchen 16,21 bis 17,2 Proz. desselben.

Die Spaltung des „Jecorins“ bei der Autolyse erfolgt sehr bald und ist in wenigen Tagen beendet. Bei einem gröfseren, der oberflächlichen Wirkung siedenden Wassers ziemlich stark ausgesetzten Leberstück fand ich nach fünf Tagen noch 6 bis 7 Proz., nach sechs Tagen noch 3,47 resp. 3,36 Proz. „Jecorin“ im Ätherextrakt, nach sieben Tagen keine Spur mehr. Das Verschwinden desselben erlaubt demnach eine Kontrolle des Verlaufs der Autolyse. In einem solchen Versuche war sie bei über ein Jahr unter Toluol bei cirka 40° C. aufbewahrtem Leberbrei noch nicht beendigt, wenigstens enthielt dessen Ätherextrakt noch 5,9 Proz. „Jecorin“. (Die Untersuchung seiner Spaltungsprodukte im Extrakt der autolysierten Leber unterblieb als nicht zur Aufgabe gehörig.)

Schliefslich mag noch erwähnt werden, dafs in der ätherischen Lösung der hohen Fettsäuren des Extrakts durch reichlichen Zusatz von absolutem Alkohol ein flockiger Niederschlag erhalten wird, dessen Natur weiter untersucht werden soll. Bei der frischen wie autolysierten Leber in gleicher Weise auftretend, ist er in Wasser, angesäuertem Wasser, wie absolutem Alkohol ganz unlöslich, in saurem Äther nur schwer löslich.

Wenn man die intensiven Veränderungen berücksichtigt, welche autolysierte Organe namentlich bei aseptischer Aufbewahrung erleiden, so erscheint der Gedanke, dafs dabei neben der hohen Fettspaltung auch eine Bildung von Fett resp. Fettsäuren stattfindet, von vornherein gewifs nicht unzulässig. Wie man sieht, ist aber solche postmortale Fettbildung in der Leber und, wie aus Kraus' Versuchen hervorgeht, auch in der Niere nicht gegeben. Die Frage, ob das bei der „fettigen Degeneration“ in der Leber und anderen parenchymatösen Organen auftretende Fett ganz als dorthin transportiertes anzusehen ist, wie es Rosenfeld äufserst wahrscheinlich gemacht hat, oder ob es daneben doch eine vitale intracelluläre Fettbildung giebt (Lindemann), wird durch diesen Befund natürlich nicht entschieden.

IX.

Über die koagulierende Wirkung des Papayotins auf Peptonlösungen*).

Von Privatdozent Dr. **D. Kurajeff.**

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der militär-medizin. Akademie zu St. Petersburg.

Im Jahre 1895 unterzog W. Okunew in seiner Dissertation: „Über die Rolle des Labfermentes bei den Assimilationsprozessen des Organismus" die von Prof. A. Danilewsky entdeckte merkwürdige Erscheinung, dafs Labextrakt eine koagulierende Wirkung auf Peptonlösungen ausübt, einer genaueren Untersuchung. Diese Erscheinung besteht in folgendem: Setzt man einer mehr oder weniger konzentrierten, ganz klaren Lösung der Produkte der Pepsin- oder Trypsinverdauung verschiedener Eiweifsarten (Fibrin, Myosin, Kasein u. a.), nachdem das Acidalbumin und koagulierbare Eiweifs aus ihr entfernt worden ist, eine geringe Quantität Labextrakt zu, so trübt sich das Gemenge bei ca. 40° C. nach einiger Zeit, und es bilden sich Flocken, welche allmählich an Menge zunehmen; wenn die Peptonlösung eine konzentrierte (ca. 35proz.) war, gerinnt sie über Nacht zu einer ziemlich festen, flockigen Masse; man kann dann das Gefäfs umstülpen, ohne dafs auch nur ein Tropfen abfliefst.

Diese Einwirkung des Labextraktes auf Peptonlösungen**) ist fermentativer Natur, da die Extrakte durch Kochen ihre Wirksam-

---

*) Nach einem in der Gesellschaft russischer Ärzte zu St. Petersburg am 25. Januar 1901 gehaltenen Vortrage; vorläufige Mitteilung im Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1901, Nr. 9.

**) Als „Peptone" bezeichne ich sämtliche Verdauungsprodukte der Eiweifssubstanzen, d. h. die Albumosen und die Peptone im Sinne Kühnes.

keit einbüfsen. Aus der Thatsache, dafs bestimmte Bedingungen die Fähigkeit des Labextraktes, Milch zu koagulieren, in gleicher Weise beeinflussen, wie seine Wirkung auf Peptonlösungen, schliefst Okunew, dafs beide Wirkungen einem und demselben Ferment, nämlich dem Chymosin zukommen.

Auch D. Lawrow*) untersuchte die koagulierende Wirkung des Chymosins auf peptische und tryptische Verdauungsprodukte. Er fand dabei, dafs diejenigen Verdauungsprodukte des Fibrins, welche nicht mehr mit schwefelsaurem Ammon ausfällbar sind, durch Labferment nicht koagulieren.

W. Sawjalow**) unterzog sowohl die Koagulation von Peptonlösungen durch Lab, als auch das bei diesem Prozefs entstehende Produkt einer näheren Untersuchung. Die wichtigsten Ergebnisse derselben sind folgende:

Die Bildung des gallertigen oder flockigen Niederschlages in Peptonlösungen nach Labzusatz entspricht einer Fermentwirkung. Das Lab übt seine Wirkung am ausgiebigsten bei saurer Reaktion und in Gegenwart von Kalksalzen aus. Die bedeutendsten Niederschläge geben Proto- und Heteroalbumosen; Deuteroalbumosen liefern nur einen unbedeutenden Niederschlag, Amphopepton und Antipepton gar keinen.

Die Niederschläge, welche nach Labzusatz zu Peptonlösungen entstehen, enthalten einen Eiweifskörper sui generis, den Sawjalow „Plastein" benannt hat. Dieses „Plastein" ist in Wasser nicht löslich, löst sich ein wenig in Salzlösungen, sehr leicht in verdünnten Laugen und Säuren und scheidet sich bei Neutralisation derselben wieder aus. Charakteristisch ist seine Fähigkeit, nach Zusatz einer bestimmten Quantität Lauge und Erwärmung ein gallertiges Koagulum zu bilden.

Ihrer elementaren Zusammensetzung nach stehen die Plasteine verschiedener Herkunft (vom Eieralbumin, Myosin, Kasein) einander ziemlich nahe, nur das aus Wittepepton (vom Fibrin) gewonnene Plastein differiert in seiner Zusammensetzung von den übrigen. Ihren Eigenschaften und ihrer Zusammensetzung nach stehen die Plasteine dem sogenannten Antialbumid Kühnes am nächsten.

---

*) D. Lawrow: Über den Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung des Eiweifses. Dissert. St. Petersb. 1897 (russisch).

**) W. Sawjalow: Zur Theorie der Eiweifsverdauung. Dissert. Jurjew 1899 (russisch) und Pflügers Arch. 85, 171 (1901).

Im vorigen Jahre teilte W. Okunew*) Thatsachen mit, welche ihn zu der Annahme veranlafsten, dafs es im tierischen Organismus zwei Arten von Labferment giebt. Im Pankreassaft von Herbivoren und vom Hunde findet sich stets ein Labferment, welches zur Entfaltung seiner Wirkung anderer Bedingungen benötigt als das Labferment des Magens. Die beiden Arten von Labferment unterscheiden sich u. a. in folgendem: Das Magenlab wird durch Pankreasverdauung rasch zerstört, während das Pankreaslab unter gleichen Bedingungen unversehrt bleibt. Das Lab des Magens, namentlich des Kalbsmagens, koaguliert Peptonlösungen bei Anwesenheit von 0,1 Proz. Natriumkarbonat fast gar nicht, während das Ferment des Pankreassaftes noch bei 0,5 bis 1 Proz. Na_2CO_3-Gehalt prompt wirkt. Kalbsblutplasma zerstört das Magenlab, während es das Pankreaslab fast gar nicht verändert.

Die bemerkenswerte Fähigkeit des Labfermentes oder richtiger Labextraktes, in Peptonlösungen eigenartige, von den Peptonen, resp. Albumosen selbst verschiedene Niederschläge zu erzeugen, ist augenscheinlich von hervorragender physiologischer Bedeutung. Es liegt die Vermutung nahe (A. Danilewsky), dafs in diesem Ferment jenes geheimnisvolle Agens vorliegt, welches im Magendarmkanale des Tieres Albumosen und Peptone in einen ganz anders gearteten Körper umwandelt. Ich will jedoch hier auf diese Frage nicht näher eingehen und verweise in dieser Beziehung auf die Dissertationen von W. Okunew und W. Sawjalow.

Da die Frage nach der chemischen Natur der „Plasteine“ bis jetzt noch wenig aufgeklärt ist, unternahm ich eine nähere Untersuchung derselben, wobei ich jedoch zunächst die Wirkungsweise eines dem Pflanzenreiche entstammenden analog wirkenden Fermentes ins Auge fafste.

Wie bekannt, enthalten nämlich viele Pflanzen eine fermentartige Substanz, welche Milch koaguliert; manche haben darum schon längst bei der Käsebereitung praktische Verwertung gefunden. So findet sich ein labähnliches Ferment z. B. bei der Artischocke, bei Carlina acaulis, Galium verum u. a. Aufserdem enthält der Milchsaft unreifer Früchte des Feigenbaumes, der Ananaspflanze und der Carica Papaya ein proteolytisches und zugleich ein die Milch energisch koagulierendes Ferment. Das Auftreten beider Fermente nebeneinander ist im höchsten Grade

*) W. Okunew, Refer. im „Wratsch“ 1900, Nr. 21, S. 662.

bemerkenswert und erinnert an das Zusammenvorkommen derselben in Magenschleimhaut und Pankreas.

Ich unternahm es daher auch, die Wirkung von wässerigen Papayotinlösungen auf Peptonlösungen zu erproben. Meinen Erwartungen entsprechend zeigten Vorversuche, dafs das Papayotin in aus verschiedenen Eiweifssubstanzen hergestellten Peptonlösungen ganz ähnliche Niederschläge erzeugt, wie das Labextrakt.

Obgleich diese Untersuchungen noch lange nicht zum Abschlusse gelangt sind, möchte ich doch schon jetzt einige meiner Ergebnisse veröffentlichen, wobei ich mir vorbehalte, die Frage in gewisser Richtung weiter zu verfolgen.

1. Wirkung des Papayotins auf Peptone verschiedener Herkunft.

Zuvörderst sei in allgemeinen Zügen die Wirkung des Papayotins auf Peptone verschiedener Herkunft beschrieben.

Für meine Versuche verwandte ich stets von Merck bezogenes Papayotin. Dasselbe löste sich in destilliertem Wasser, namentlich nach Zusatz einer geringen Menge von Kochsalz, fast vollständig. Gewöhnlich benutzte ich 5prozentige Lösungen. Dieselben reagieren auf Lakmus schwach sauer, sie zersetzen sich beim Stehen ziemlich rasch, wobei sich ein flockiger Niederschlag bildet und die Reaktion in eine alkalische umschlägt. Setzt man der Papayotinlösung einige Tropfen Chloroform hinzu, so bleiben sie mehrere Tage lang unverändert. Milch wurde durch von mir benutzte Papayotinlösungen energisch koaguliert; die Kaseinflocken lösten sich dann beim Stehen in kurzer Zeit fast vollständig wieder auf.

Das Wittepepton verwandte ich gewöhnlich in 10- oder 20prozentiger Lösung, die vorher vom Neutralisationsniederschlage und dem beim Sieden ausfallenden Eiweifs befreit war. Zur Herstellung von Muskeleiweifspepton diente Rindfleisch. Dasselbe wurde fein zerhackt, der erhaltene Brei mehrmals mit Wasser ausgewaschen und drei Tage der Einwirkung von gut wirksamem Pepsin (Grübler) unterworfen; die Verdauungsflüssigkeit wurde in bekannter Weise von Acidalbumin und koagulierbarem Eiweifs befreit und schliefslich im Wasserbade bis zu einem Gehalte von ca. 18 Proz. Trockenrückstand eingedampft. Kaseinpeptone stellte ich in üblicher Weise her: ich koagulierte verdünnte Milch mit Essigsäure, löste den mit Wasser gut ausgewaschenen Niederschlag in Natriumkarbonat auf, fällte ihn wiederum mit Essigsäure u. s. w.; das gut ausgewaschene Kasein digerierte ich gleichfalls 16 Stunden lang mit Grüblerschem Pepsin, schliefslich dampfte ich die von dem unbedeutenden Niederschlage durch Neutralisation und Aufkochen befreite Kaseoselösung im Wasserbade bis zu einem Gehalt von ca. 18,5 Proz. Trockenrückstand ein.

Nimmt man 10 ccm einer 20prozentigen (oder noch konzentrierteren) Wittepeptonlösung von amphoterer Reaktion, fügt 1 ccm einer 5prozentigen Papayotinlösung hinzu und bringt die vollkommen klare und vor Verdunsten geschützte Flüssigkeit in das auf 40 bis 45° erwärmte Wasserbad, so zeigt sie in den ersten Stunden keine merkliche Veränderung, über Nacht jedoch wandelt sie sich durch die Bildung eines lockeren, feinflockigen Niederschlages in eine gallertartige, opake Masse um. War die Peptonlösung eine 10- bis 15prozentige, so trübt sich die Flüssigkeit schon nach einer halben Stunde, und es bildet sich bald ein voluminöser Niederschlag, welcher sich bei längerem Stehen anscheinend nicht verändert. Die Bildung solcher Niederschläge geht noch reichlicher bei schwach alkalischer, durch Natriumkarbonat bedingter Reaktion von statten, schlechter bei schwach saurer Reaktion.

Stellt man das Probiergläschen mit 10 ccm etwa 20prozentiger Peptonlösung und 1 ccm Papayotin auf eine halbe Stunde in siedendes Wasser, so bilden sich allmählich spärliche zarte Flocken, und läfst man es dann bei 40° C. stehen, so beobachtet man keine weitere Ausfällung. Bringt man 1 ccm 5prozentiger Papayotinlösung erst auf eine halbe Stunde in ein siedendes Wasserbad, fügt dann nach Abkühlen der Flüssigkeit 10 ccm Peptonlösung hinzu und läfst das Ganze bei 40° C. stehen, so kommt es in der Flüssigkeit, abgesehen von der anfänglichen Trübung, selbst nach längerer Zeit (24 Stunden und mehr) nicht zur Bildung eines weiteren Niederschlages.

Ebenso reichliche Niederschläge, wie sie bei Einwirkung von 1 ccm Papayotin auf 10 ccm Peptonlösung entstehen, können auch erzielt werden, wenn man zu dem Versuche nur $^1/_2$ ccm und sogar $^1/_{10}$ ccm Papayotinlösung verwendet, nur braucht dann ihre Abscheidung viel mehr Zeit.

Gleich den Wittepeptonlösungen geben auch die Lösungen von Muskeleiweifspeptonen (18 und 9 Proz.) und von Kaseosen (18,5 Proz.) mit Papayotin feinflockige, voluminöse Niederschläge.

Aus dem Angegebenen ergiebt sich, dafs Papayotin auf Lösungen von Peptonen verschiedener Herkunft energisch koagulierend einwirkt und dafs diese Wirkung durch Erhitzen der Fermentlösung auf 100° aufgehoben wird.

2. Eigenschaften der aus Wittepeptonlösungen erhältlichen Niederschläge.

Das aus Wittepeptonlösungen durch Papayotinzusatz entstehende Koagulationsprodukt stellte ich mir in folgender Weise dar:

Zu 200 ccm einer 15prozentigen Wittepeptonlösung setzte ich Natriumkarbonat bis zu einem Gehalte von 0,5 Proz. (1 g), dann 10 ccm einer 5prozentigen Papayotinlösung und brachte die Flüssigkeit in ein auf 42° C. erwärmtes Wasserbad. In den nächsten Stunden wurde sie ein wenig trübe und begann zu opalisieren. Erhitzte ich eine der Flüssigkeit entnommene Probe bis zum Sieden, so entstand ein ziemlich bedeutender, feinflockiger, voluminöser Niederschlag. Um Fäulnis hintanzuhalten, fügte ich eine unbedeutende Quantität Chloroform hinzu. Über Nacht verdickte sich die Flüssigkeit und wurde gallertig. Es war mit Lakmus deutliche Ammoniakentwickelung nachweisbar. Sodann filtrierte ich den Niederschlag ab, was ziemlich leicht von statten ging. Im Filtrat liefs sich durch Neutralisation fast gar kein Niederschlag erzielen; beim Aufkochen des neutralisierten Filtrates trat nur spärliche, flockige Fällung ein.

Der auf dem Filter befindliche Niederschlag, welcher das Produkt der Papayotineinwirkung darstellt, wurde mehrmals mit Wasser gewaschen; er stellte eine gallertige Masse dar, die sich leicht zerbröckeln liefs und sich in 0,4prozentiger Natronlauge löste. Die alkalische Lösung wurde neutralisiert, wobei sich ein äufserst voluminöser, halbdurchsichtiger Niederschlag bildete. Seine Bildung begann noch bei deutlich alkalischer Reaktion. Das Neutralisieren mufs sehr vorsichtig ausgeführt werden, da sich der Niederschlag schon beim geringsten Säureüberschufs wieder löst. Schliefslich filtrierte ich den Neutralisationsniederschlag ab und wusch ihn so lange mit Wasser, bis das Filtrat keine Spur von Biuretreaktion mehr zeigte.

Ein Teil des so erhaltenen Niederschlages wurde mit 10proz. Na Cl-Lösung digeriert, ein anderer in 1 proz. Sodalösung, ein dritter in ca. 0,3prozentiger Salzsäure gelöst. Der 24 Stunden mit 10proz. Kochsalzlösung digerierte Niederschlag wurde abfiltriert, wobei sich ergab, dafs das Filtrat nur Spuren von Eiweifs enthielt. Die Lösungen des Niederschlages in 0,3prozentiger Salzsäure und 1prozentiger Natriumkarbonatlösung geben beim Aufkochen keinen Niederschlag, wohl aber auf Zusatz von selbst geringen Mengen gesättigter Ammonsulfatlösung. Sie geben die Biuretreaktion (violettrot), die Millonsche, Adamkiewiczsche und Xanthoproteinreaktion; bei letzterer Reaktion tritt schon ohne Erwärmung

gelbe Färbung ein; Niederschläge, welche sich bei Zusatz von Salpetersäure zu den Lösungen bilden, sind in überschüssiger Säure selbst beim Erwärmen unlöslich; durch Aufkochen mit alkalischer Bleiacetatlösung entsteht nur eine schwache, gelbbräunliche Färbung der Flüssigkeit. Setzt man dem in Wasser suspendierten Niederschlage wenig Alkali zu, so quillt er zunächst stark auf; bei weiterem Zusatz löst er sich zu einer vollkommen klaren Flüssigkeit. Erwärmt man den in Wasser suspendierten Niederschlag nach Zusatz von Lauge ein wenig, so wandelt sich die Flüssigkeit rasch in eine feste, halbdurchsichtige, gallertartige Masse um.

Interessant ist das Verhalten des Niederschlages bei Pepsin- und Papayotinverdauung. Meine einschlägigen Versuche sind dreimal stets mit demselben Resultate angestellt worden. Untersucht wurden zwei Präparate von verschiedener Darstellung. Ich lasse hier die Beschreibung eines Versuches folgen.

Ein Teil des Niederschlages wurde in ca. 0,5 proz. Salzsäure, ein anderer in 0,25 proz. Natriumkarbonatlösung aufgelöst.

Pepsinverdauung. Es wurden 30 ccm der Lösung des Niederschlages in 0,5 proz. Salzsäure genommen, eine geringe Menge Grüblersches Pepsin hinzugethan und die Flüssigkeit in den auf 40° eingestellten Brütschrank gebracht. Am folgenden Tage wurde die Flüssigkeit neutralisiert, wobei sich nur ein geringer Niederschlag ausschied. Hierauf wurde sie im Wasserbade gekocht und nach dem Erkalten filtriert. Dem klaren neutralen Filtrate wurde dann ein gleiches Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung hinzugefügt, wobei sich ein ziemlich bedeutender flockiger, aus primären*) Albumosen bestehender Niederschlag ausschied. Der von dem Niederschlage abfiltrierten Flüssigkeit wurde noch ein halbes Volumen Ammonsulfatlösung zugefügt, worauf jedoch nur eine kaum merkliche Trübung eintrat. Als aber nach einigen Stunden die Flüssigkeit mit Ammonsulfat gesättigt wurde, bildete sich ein aus sekundären Albumosen (entsprechend der Deuteroalbumose A und B von Pick) bestehender bedeutender, flockiger Niederschlag.

In einem Kontrollversuche löste ich eine etwa ebenso grofse Menge Grüblersches Pepsin, wie in dem vorhergehenden Versuche, in 30 ccm der 0,5 Proz. Salzsäure enthaltenden Lösung auf und stellte die Flüssigkeit in den Brütschrank. Als ich am folgenden Tage die Flüssigkeit neutralisierte und mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzte, trübte sie sich kaum merklich, während sich nach Sättigung derselben mit Ammonsulfat ein bedeutender Niederschlag ausschied.

Papayotinverdauung. Zu 40 ccm einer 0,25 procentigen Natriumkarbonatlösung des Niederschlages wurden 2 ccm einer 5 prozentigen Papayotinlösung hinzugethan, die Flüssigkeit auf 20 Stunden in den Brütschrank gestellt. Über Nacht hatte sich die Flüssigkeit im

*) „Primär" im Sinne von Kühne und Neumeister.

Glase infolge der Ausscheidung eines gallertartigen Niederschlages verdickt. Nun wurden 20 ccm Wasser hinzugefügt und die Flüssigkeit nach erfolgter Neutralisation von dem ausgiebigen, voluminösen Niederschlage abfiltriert*). Das neutrale Filtrat wurde eine Zeit lang im Wasserbade erhitzt und von der sich hierbei bildenden Trübung abfiltriert. Fügte man ihm ein gleiches Volumen Ammonsulfat hinzu, so schied sich ein ziemlich bedeutender, aus primären Albumosen bestehender Niederschlag aus. In der abfiltrierten Flüssigkeit entstand bei Sättigung mit Ammonsulfat nur ein sehr unbedeutender, aus sekundären Albumosen bestehender Niederschlag.

Ein zweiter, ganz ähnlich angestellter Versuch ergab ebenfalls die Bildung von primären Albumosen, hingegen konnte im Filtrate durch Sättigung mit Ammonsulfat nicht einmal eine Trübung erhalten werden.

Aus den angeführten Versuchen ist zu ersehen, dafs der (oder die) Eiweifskörper, welcher nach Einwirkung von Papayotin auf Wittepeptonlösungen entsteht, sich von den Albumosen desselben Peptons streng unterscheidet. Bei der Pepsinverdauung giebt dieser Körper, soweit man nach dem Verhalten der Verdauungsprodukte zu gesättigter Ammonsulfatlösung schliefsen kann, hauptsächlich sekundäre Albumosen und zwar vorzugsweise den aus neutraler Lösung durch Ganzsättigung fällbaren Anteil (B-Albumose von E. P. Pick) und nur eine unbedeutende Menge primärer Albumosen. Der verdauenden Einwirkung des Papayotins widersteht dieser Körper in bedeutendem Mafse und scheidet sich sogar noch nach 20 Stunden fast in seiner ursprünglichen Menge als Neutralisationsniederschlag aus; nur in unbedeutender Menge wandelt er sich in sekundäre Albumosen um, deren Auftreten eigentlich erst darauf hinweist, dafs die Verdauung wirklich stattgefunden hat.

Die Gegenwart einer geringen Menge primärer Albumosen in der Flüssigkeit beweist nämlich noch nicht, dafs der zu untersuchende Körper verdaut worden ist, da die Papayotinlösung an und für sich Eiweifssubstanzen enthält, welche durch ein gleiches Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung niedergeschlagen werden, d. h. also Substanzen von dem Verhalten der primären Albumosen.

3. Wirkung des Papayotins auf Lösungen primärer und sekundärer Albumosen.

Die von mir in dieser Richtung angestellten Versuche beziehen sich fürs erste nur einerseits auf das Gemenge der durch Halb-

*) In anderen analogen Versuchen, wo in der Sodalösung augenscheinlich weniger von dem ursprünglichen Niederschlage enthalten war als im eben beschriebenen Versuche, trübte sich die Flüssigkeit über Nacht nur leicht und schied erst, nachdem sie neutralisiert war, einen voluminösen Niederschlag aus.

sättigung mit Ammonsulfat fällbaren sogenannten primären Albumosen, andererseits auf das Gemenge der durch Ganzsättigung bei neutraler Reaktion fällbaren Deuteroalbumosen (Picks A- und B-Albumose) des Fibrins. Zu ihrer Darstellung bediente ich mich der einfachen und am besten begründeten Methode von E. P. Pick*).

Eine 10prozentige Wittepeptonlösung, welche vom Acidalbumin und koagulierbaren Eiweifs befreit worden war und amphotere Reaktion zeigte, wurde mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt. Der aus primären Albumosen bestehende Niederschlag wurde abfiltriert, mehrmals mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen, dann neuerdings in Wasser gelöst, von ausgeschiedener Dysalbumose getrennt, nochmals mit dem gleichen Volumen Ammonsulfatlösung ausgefällt, und nach Auswaschen mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung zwei Tage lang gegen Leitungswasser dialysiert. Hierauf wurde die Lösung mit dem aus Heteroalbumose bestehenden Niederschlage nach Zusatz einer geringen Menge Kochsalz im Wasserbade erwärmt, filtriert und eingedampft. Die von mir zu meinen Versuchen verwandte Lösung primärer Albumosen enthielt etwa 11 Proz. Trockenrückstand, dabei ziemlich viel Ammonsulfat. Die von den primären Albumosen abfiltrierte Flüssigkeit wurde mit Ammonsulfat bei amphoterer Reaktion gesättigt. Nach einigen Tagen wurde der aus sekundären Albumosen (A- und B-Albumose) bestehende Niederschlag abfiltriert, mit gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen, in Wasser gelöst und zwei Tage lang dialysiert, schliefslich der Inhalt des Pergamentschlauches bis zu einem Gehalte von ca. 15 Proz. Trockenrückstand eingedampft.

Das Resultat meiner zahlreichen Versuche, welche die Wirkung des Papayotins auf Lösungen primärer Albumosen betrafen, ist kurz folgendes: Bei amphoterer oder durch Natriumkarbonat bedingter alkalischer Reaktion geben ca. 1prozentige Lösungen primärer Albumosen, selbst bei vielstündiger Einwirkung von Papayotin keinen oder nur einen unbedeutenden, flockigen Niederschlag. Auch bei schwach saurer (durch HCl bedingter) Reaktion veranlassen sie nur eine unbedeutende flockige Abscheidung. Bei Neutralisation der alkalischen Flüssigkeit bildet sich jedoch ein bedeutender flockiger Niederschlag; das Gleiche geschieht beim Aufkochen sowohl der alkalischen, als auch der sauren Flüssigkeiten.

Verdünnt man die anfänglich ca. 1prozentige Lösung primärer Albumosen auf das zweifache, noch besser auf das dreifache und vierfache Volumen und löst man den sich hierbei bildenden Niederschlag durch Zusatz einiger Tropfen 10prozentiger Sodalösung, so liefern derartige Lösungen mit 5procentigem Papayotin

*) E. P. Pick, Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 246 (1898).

ziemlich rasch flockige Niederschläge. Auch das alkalisch reagierende Filtrat giebt beim Aufkochen mehr oder weniger bedeutende flockige Fällung.

Ich lasse hier die genaue Beschreibung eines Versuches folgen. 50 ccm der ursprünglichen 1 1 prozentigen Lösung wurden mit 150 ccm Wasser verdünnt, der hierbei sich bildende Niederschlag durch Zusatz von Kochsalz und etwa 3 ccm 10 prozentiger Natriumkarbonatlösung aufgelöst. Der klaren, alkalisch reagierenden Flüssigkeit wurden 5 ccm einer 5 prozentigen Papayotinlösung hinzugefügt und das Ganze auf 42° C. gebracht. Nach 20 Minuten begann sich die Flüssigkeit zu trüben, über Nacht setzte sich ein unbedeutender flockiger Niederschlag ab. Bei Neutralisation der Flüssigkeit entstand ein ziemlich bedeutender flockiger Niederschlag; die von diesem abfiltrierte Flüssigkeit gab beim Aufkochen ziemlich starke Fällung. Der anfänglich erhaltene und der nach Neutralisation entstandene Niederschlag wurden zusammen abfiltriert; auf dem Filter blieb eine klebrige, gelbbraune Masse, welche sich leicht in verdünnter Sodalösung auflösen und aus dieser wieder durch Neutralisation fällen liefs. Der ausgewaschene, bräunlich gefärbte Niederschlag zeigte in seinem Verhalten gegen Salpetersäure und bei sonstigen Eiweifsreaktionen keine Abweichung von dem Körper, welcher direkt aus der Wittepeptonlösung durch Einwirkung von Papayotin erhalten wird, wohl aber in seinem Aussehen (er stellte eine bräunliche, zusammengesinterte Masse dar) und darin, dafs er beim Erwärmen mit einer unbedeutenden Menge Natriumkarbonatlösung keine gallertartige Substanz bildete.

Im höchsten Grade bemerkenswert ist die Wirkung des Papayotins auf Lösungen sekundärer Albumosen.

50 ccm einer etwa 15 prozentigen Lösung sekundärer Albumosen wurden mit $^1/_2$ ccm einer 10 prozentigen Natriumkarbonatlösung und 5 ccm 5 prozentigen Papayotins versetzt und auf 42° C. gebracht. Schon nach einer halben Stunde trübte sich die Flüssigkeit, wurde erst dickflüssig, dann gallertig. Am nächsten Tage wurde abfiltriert, wobei auf dem Filter ein sehr reichlicher gallertiger, halbdurchsichtiger Niederschlag zurückblieb. Das Filtrat gab beim Neutralisieren keinen Niederschlag, doch setzten sich beim Sieden im Wasserbade einige zarte Flocken ab. Verdünnte ich die (15 prozentige) Albumosenlösung mit dem gleichen Volumen Wasser, fügte etwas Natriumkarbonatlösung und dann Papayotinlösung hinzu, so trübte sie sich im Laufe mehrerer Minuten sehr stark, und es schied sich rasch ein Niederschlag ab, welcher das ganze Volumen der Flüssigkeit einnahm.

Der aus der unverdünnten Albumoselösung erhaltene gallertige, in verdünnter Sodalösung schwer lösliche Niederschlag wurde mit Wasser ausgewaschen und mit 0,4 proz. Natronlauge in Lösung

gebracht. Nach dem Neutralisieren setzte sich ein feinflockiger, voluminöser Niederschlag ab, welcher abfiltriert, mit Wasser ausgewaschen und weiter in alkalischer oder saurer Lösung zu Reaktionen verwandt wurde.

Die mit Hülfe von Natriumkarbonat erzielte Lösung wandelte sich beim Erwärmen rasch in eine gallertartige Masse um, welche der früher beschriebenen, direkt aus Wittepepton erhaltenen vollkommen glich. Kochte man die alkalische Lösung des Niederschlages mit Bleiacetat auf, so nahm die Flüssigkeit nur eine gelbliche Färbung an. Der Körper gab die Millonsche, Adamkiewiczsche und die Biuretreaktion, letztere mit violettroter Nuance; mit konzentrierter Salpetersäure bildete sich ein im Überschufs der Säure und beim Erwärmen unlöslicher Niederschlag; schon in der Kälte nahm die Flüssigkeit einen gelben Farbenton an.

Wurden 40 ccm einer Lösung der Substanz in 0,5prozentiger Salzsäure mit einer geringen Quantität Grüblerschen Pepsins versetzt und bei 40° digeriert, so setzte sich in der Flüssigkeit nach 16 Stunden nur ein unbedeutender flockiger Niederschlag ab. Auch beim Neutralisieren bildeten sich nur spärliche Flocken, die augenscheinlich aus unveränderter Substanz bestanden. Das neutrale Filtrat bildete beim Kochen keinen Niederschlag, bei Zusatz des gleichen Volumens gesättigter Ammonsulfatlösung trübte sich die Flüssigkeit kaum, und erst nach Sättigung derselben mit Ammonsulfat setzte sich ein ausgiebiger, flockiger Niederschlag ab.

Eine Vergleichsprobe von 40 ccm der 0,5proz. Salzsäurelösung, welcher ungefähr ebensoviel Grüblersches Pepsin zugesetzt war wie der eben erwähnten Flüssigkeit, zeigte nahezu gleiches Verhalten. Sie gab nach Zusatz eines gleichen Volumens Ammonsulfatlösung eine kaum merkliche Trübung, während sich nach Sättigung mit Ammonsulfat ein bedeutender flockiger Niederschlag bildete.

4. Diskussion der Resultate.

Bei Betrachtung sämtlicher angeführten Thatsachen findet man, dafs das Papayotin auf Wittepepton und auf Lösungen sekundärer Albumosen fast in identischer Weise einwirkt. In beiden Fällen erhält man entweder gallertige oder sehr voluminöse, flockige Niederschläge von fast denselben Eigenschaften. Ein Unterschied besteht zwischen ihnen augenscheinlich nur in der Beziehung, dafs bei der Pepsinverdauung des aus Wittepepton gewonnenen Niederschlages sich aufser einer bedeutenden Menge sekundärer Albu-

mosen auch noch eine geringe Quantität primärer Albumosen bildet, während dies bei den aus sekundären Albumosen gewonnenen Niederschlägen nicht der Fall ist. Da bei Einwirkung von Papayotin auf Lösungen primärer Albumosen nur eine unbedeutende flockige Fällung entsteht, die in ihren Eigenschaften durchaus nicht an die oben beschriebene erinnert, so liegt die Vermutung nahe, dafs der direkt aus dem Wittepepton gewonnene Niederschlag hauptsächlich aus veränderten sekundären Albumosen (oder einer sekundären Albumose) und einer geringen Quantität veränderter primärer Albumosen besteht. Jedenfalls fehlen für die Annahme, dafs die direkt aus dem Wittepepton dargestellte Substanz kein Gemenge, sondern ein einheitlicher Körper ist, genügende Beweise.

In welchem Umfange die bei der Einwirkung von Papayotin auf Wittepeptonlösungen herrschenden Bedingungen auf die Beschaffenheit des sich bildenden Niederschlages Einfluſs ausüben, ersieht man aus folgenden Versuchen. Setzt man zu 5 ccm einer in üblicher Weise hergestellten 15prozentigen Wittepeptonlösung 1 ccm Wasser, 2 Tropfen 10prozentiger Sodalösung, 1 ccm 5prozentiger Papayotinlösung, so scheidet sich in der Flüssigkeit in einem auf 42° C. temperierten Wasserbade nach 10 bis 15 Minuten ein bedeutender flockiger Niederschlag ab. Hält man in einem Parallelversuche die nämlichen Verhältnisse ein, nur dafs anstatt 1 ccm Wasser 1 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung zugeführt wird, so beginnt die Flüssigkeit erst nach einer halben Stunde zu opalisieren, trübt und verdickt sich dann zunehmend bis zur Bildung der gallertigen Substanz. Diese Erscheinung entspricht augenscheinlich vollkommen derjenigen, welche bei Verwendung konzentrierter Wittepeptonlösung beobachtet wird. Eine ebensolche gallertige Substanz, nur etwas rascher, bildet sich auch in dem Falle, wenn statt 1 ccm einer gesättigten Ammonsulfatlösung nur 0,5 ccm verwandt wurde.

Unter diesen Bedingungen bleiben, wie mir scheint, die primären Albumosen bei der Bildung des Niederschlages unbeteiligt, die gallertige Substanz entsteht einzig und allein aus den sekundären Albumosen.

Bemerkenswert ist auch die von mir schon oben angedeutete Thatsache, dafs bei der Pepsinverdauung des aus Wittepepton gewonnenen Niederschlages sich überhaupt keine sekundäre Albumose A, deren Entstehung sich durch $^2/_3$-Sättigung der Flüssigkeit mit Ammonsulfat nachweisen liefse, bildet, während die durch Ganzsättigung fällbare Albumose B in bedeutender Menge auftritt.

Jedenfalls steht der wesentliche Anteil sekundärer Albumosen (und zwar anscheinend der Albumose B) an der Bildung des bei Einwirkung von Papayotin auf Wittepepton entstehenden Niederschlages aufser Zweifel.

In Aussehen und Eigenschaften unterscheiden sich die von

mir durch Papayotineinwirkung aus verschiedenen Peptonen erhaltenen Niederschläge, wie es scheint, nicht von den durch Einwirkung von Lab erhaltenen.

Diese Ähnlichkeit der „Papayotinniederschläge“ mit den Plasteinen von Sawjalow tritt vor allem auch darin hervor, dafs beide beim Erwärmen mit einer unbedeutenden Menge Lauge sich in eine halbdurchsichtige, gallertige Substanz umwandeln.

In einem wesentlichen Punkte freilich führen meine Befunde den Labversuchen Sawjalows gegenüber gerade zu dem entgegengesetzten Ergebnis. Bei mir bilden die sekundären Albumosen unter Einwirkung des Papayotins einen typischen und reichlichen Niederschlag, bei Sawjalow geben sie unter Einwirkung des Labs im Vergleich zu den primären Albumosen eine nur unbedeutende Fällung.

Es mufs jedoch bemerkt werden, dafs Sawjalow seine „sekundäre Albumose“ in anderer Weise darstellte als ich. Ich verfügte zweifellos über ein Gemenge von zwei sekundären Albumosen (A und B nach Pick), während die sekundäre Albumose Sawjalows möglicherweise ganz anders zusammengesetzt war. Für die Ansicht, dafs auch die sekundären Albumosen (resp. eine von ihnen) sich bei Einwirkung von Labferment leicht in eine unlösliche Modifikation umwandeln können, spricht die Beobachtung Lawrows (l. c.), wonach das „Pepton von Danilewsky“, welches seinen Eigenschaften nach der Gruppe der sekundären Albumosen zugerechnet werden mufs, leicht „albuminisiert“, d. h. durch Einwirkung von Labferment in einen unlöslichen Niederschlag übergeführt werden kann. Jedenfalls sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu entscheiden, ob die Papayotinniederschläge und die Plasteine identisch sind.

Selbstverständlich kann fürs erste die Frage, was mit den Albumosen bei ihrer fermentativen Umwandlung in eine unlösliche Substanz geschieht, noch nicht Gegenstand der Diskussion sein. Auch ist weder das Vorkommen der fraglichen Albumosenmodifikationen im tierischen Organismus bewiesen, noch ihre physiologische Bedeutung aufgeklärt, so wichtig auch diese Fragen sind.

Wie eingangs erwähnt, ist die proteolytische und labende Wirkung des Saftes von Carica Papaya längst bekannt [A. Wurtz und E. Bouchut*), S. Martin**)]. Eben solche Wirkung besitzt

*) A. Wurtz und E. Bouchut, Malys Jahresb. 1879.

**) S. Martin, daselbst 1885.

der Saft der Ananasfrucht, deren proteolytisches Ferment, das Bromelin, namentlich von R. H. Chittenden*) im Jahre 1895 studiert worden ist. S. Martin fand bei Verdauung von Fibrin durch Papain u. a. ein eigenartiges Produkt, welches später auch von Chittenden bei Bromelinverdauung des Fibrins konstatiert worden ist. Dieses Produkt erinnert den Untersuchungen von Chittenden gemäfs an Kühnes Antialbumid. Nach den mitgeteilten Untersuchungen liegt die Vermutung nahe, dass der antialbumidähnliche Körper S. Martins und Chittendens nichts anderes ist als der von mir nach Einwirkung von Papayotin auf Wittepepton erhaltene eigenartige Niederschlag.

Die Frage, welches von den im käuflichen Papayotin enthaltenen Fermenten jene von mir beschriebene Wirkung auf Albumoselösungen ausübt, kann fürs erste noch nicht endgültig entschieden werden. Auf Grund der Übereinstimmung mit der Einwirkung von Extrakten aus der Magenschleimhaut und dem Pankreas und vor allem von Labfermentlösungen auf Albumosen darf man wohl annehmen, dafs auch die entsprechende Wirkung des Papayotins auf dem in ihm enthaltenen Labferment beruht. Ich habe auch versucht, das Labferment des Papayotins zu isolieren.

S. Martin hält auf Grund seiner Untersuchung des Saftes der Carica Papaya eine der in ihm enthaltenen Albumosen, nämlich α-Phytalbumose, für die Trägerin der Fermentwirkung. Bei Sättigung des Saftes mit Kochsalz oder Bittersalz bleibt die α-Phytalbumose in der Lösung, scheidet sich aus dem Filtrate erst nach Ansäuerung oder nach Sättigung mit Natriumsulfat aus. Augenscheinlich hatte S. Martin nur die proteolytische Wirkung der α-Phytalbumose im Auge. Was den Ananassaft anbetrifft, so giebt bereits Chittenden eine Methode zur Trennung des proteolytischen Fermentes von dem Labferment an. Sättigt man nämlich den Ananassaft mit Chlornatrium, so scheidet sich ein Niederschlag aus, der aus ein wenig Globulin, Protalbumose und Heteroalbumose besteht. Dialysiert man die Lösung dieses Niederschlages, so scheidet sich ein Eiweifs aus, welches keine proteolytische Wirkung mehr, wohl aber Labwirkung besitzt. Die vom Chlornatriumniederschlage abfiltrierte Flüssigkeit giebt mit Ammonsulfat einen Niederschlag, welcher noch eine schwache proteolytische, aber keine labende Wirkung mehr besitzt. Der überwiegende Teil des „Bromelins“, des proteolytischen Fermentes, befindet sich

*) R. H. Chittenden, Malys Jahresber. 1895.

in dem Kochsalzniederschlage, nämlich in demjenigen Teile desselben, welcher weder durch Dialyse, noch durch Alkohol abzuscheiden ist.

In Anbetracht der Befunde Chittendens am Ananassafte versuchte ich, beide Fermente auch im Papayotin zu trennen. Ich sättigte eine 2,5prozentige Papayotinlösung mit Kochsalz, worauf sich über Nacht ein unbedeutender Niederschlag bildete. Ein Teil des Kochsalzfiltrates wurde mit Natriumsulfat gesättigt, ein anderer mit Essigsäure stark angesäuert, wobei sich in beiden Fällen ein ausgiebiger Niederschlag ausschied. Jeder der Niederschläge wurde in entsprechender Weise noch zweimal gelöst und gefällt. Die wässerigen Lösungen sämtlicher drei Niederschläge ergaben eine wenn auch abgeschwächte koagulierende Wirkung auf Albumosen und eine ebensolche auf Milch. Die Kaseinflocken lösten sich aber allmählich fast vollständig auf. Es gelang mir also der Versuch der Trennung beider Fermente im Papayotin nicht. In Anbetracht der vor kurzem geäufserten interessanten Meinung von Prof. M. Nencki*) über die komplizierte Natur des Pepsins erscheint ein weiteres Studium des Papayotins höchst wünschenswert. Ich gedenke mich mit dieser Frage sowie mit der Beziehung der durch Papayotin erhältlichen Produkte zu den „Plasteinen“ in nächster Zeit eingehender zu beschäftigen.

*) M. Nencki und N. Sieber, Zeitschr. f. physiolog. Chem. 32, 291 (1901).

X.

Über die Beziehung der Autolyse zur Blutgerinnung.

Von Dr. **H. Conradi.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

Die vorliegenden Untersuchungen sollen einen Beitrag liefern zu der Frage, ob die durch Autolyse aus den Organelementen entstehenden Produkte einen Einflufs auf das Gerinnungsvermögen des Blutes ausüben. Nachdem die von E. Salkowski*) entdeckte Autolyse unter Chloroformwasser aufbewahrter Organe durch Martin Jacoby**) im hiesigen Institut als ein Vorgang erkannt worden ist, dessen Bedingungen schon in der lebenden Zelle gegeben sind, ist die Auffassung berechtigt, in den autolytischen Spaltungsprodukten die Zwischenglieder des intermediären Stoffwechsels zu suchen. Zwischen Blut und Geweben besteht nun ein so reger Verkehr und Austausch, dafs eine gegenseitige Beeinflussung ohne weiteres angenommen werden mufs, und es ist zu erwarten, dafs sich diese Wechselwirkung auch in betreff der Gerinnbarkeit des Blutes äufsert. Bereits die Untersuchungen von Alexander Schmidt und seinen Schülern, von Wooldridge, Lilienfeld und Contejean deuten in der That darauf hin, dafs an der Erhaltung des flüssigen Zustandes des Blutes neben den autochthonen Blutelementen die den Geweben entstammenden Stoffwechselprodukte beteiligt sein können. Ferner haben die experimentellen Ergebnisse von Pawlow***) gezeigt, dafs Blut, welches nach dem Ludwigschen Verfahren durch Herz und Lunge allein zirkuliert, seine Gerinnungsfähigkeit einbüfst. Dasselbe fand Bohr†) nach Ausschaltung von Darm und Leber aus dem Kreislauf. Ebenso haben die zahlreichen Untersuchungen über die Blutwirkung der „Pepton"injektion schliefslich gelehrt,

*) Zeitschr. f. klinische Medizin. Supplement z. **17** (1890).

) Zeitschr. f. physiol. Chemie. **30 (1900).

***) Du Bois' Archiv. S. 452 (1887).

†) Centralbl. f. Physiol. No. 11, S. 262 (1888).

dafs die Leber eine Bildungsstätte des gerinnungshemmenden Agens darstellt. Wenn auch vielleicht die Selbstverdauung der Organe im Brutschrank ein überlebensgrofses Bild von den im Tierkörper verlaufenden Abbauvorgängen liefert, so enthebt das nicht der Verpflichtung, die Rückwirkung dieser Prozesse auf die Vorgänge im Blute zu untersuchen. Das hat zuerst M. Jacoby*) versucht. Bei Mischung von autolysiertem Lebersaft mit Hundeblut nahm er deutliche Gerinnungshemmung wahr. War jedoch der autolytische Lebersaft vorher der Dialyse gegen fliefsendes Wasser unterworfen worden, so äufserte er keine Wirkung. Neuerdings haben noch E. P. Pick und K. Spiro**) festgestellt, dafs bei Autolyse des Fibrins zwar keine gerinnungshemmende Substanz auftritt, dafs aber die Muttersubstanz derselben erhalten bleibt.

Für die vorliegende Frage war zu untersuchen, ob nicht, ähnlich der Leber, auch andere Organe einen Einfluſs auf die Blutgerinnung erkennen lassen. Dabei war zunächst die Einwirkung der frischen Organe auf die extravaskuläre Blutgerinnung zu prüfen. Hieran mufsten sich die Versuche mit den autolysierten Organen anschliefsen. Diesen in vitro ausgeführten Versuchen habe ich noch eine Anzahl von Experimenten beigesellt, bei denen die Auszüge frischer und autolysierter Organe direkt in das Blut lebender Tiere eingebracht wurden.

1. Die extravaskuläre Wirkung der Preſssäfte auf die Blutgerinnung.

Die Untersuchungen von Buchanan***), Wooldridge†), Foà u. Pellacani††) sowie insbesondere von Alexander Schmidt†††) und seinen Schülern F. Rauschenbach*†), E. Grubert**†), W. Groh-

*) A. a. O.

**) Zeitschr. f. physiol. Chemie. 31 (1900).

***) The London Medical Gazette. Vol. I. 617 (1845). Proceed. of Glasgow Phil. Soc. 19. Feb. 1845.

†) Du Bois' Archiv 387 (1881); Festschrift für C. Ludwig. Leipzig 1887. 221. Die Gerinnung des Blutes von L. C. Wooldridge. (Herausgegeben von M. v. Frey.) Leipzig 1891.

††) Ref. Malys Jahresber. 13, 129 (1884).

†††) Zur Blutlehre von Alexander Schmidt. Leipzig 1892. Weitere Beiträge zur Blutlehre von Alexander Schmidt. (Nach des Verfassers Tode herausgegeben.) Wiesbaden 1895.

*†) Inaug.-Dissert. Dorpat 1883.

**†) Inaug.-Dissert. Dorpat 1883.

mann*), J. von Samson-Himmelstjerna**), A. Nauck***) u. a. haben zwar bereits erwiesen, dafs die wässerigen Auszüge tierischer Organe (Lymphdrüsen, Milz, Leber, Magen, Pankreas, Muskel, Hornhaut) sowie pflanzlicher Zellen (Schimmelarten und Bakterien) im Reagenzglas eine gerinnungsbeschleunigende Wirkung auf die Transsudate der serösen Häute, ferner auf Pferdeblutplasma oder Peptonplasma ausüben. Gegenwärtig besitzen wir jedoch in der Buchnerschen hydraulischen Presse ein so vortreffliches Mittel, um zu einer ergiebigen Extraktion des Zellenmaterials zu gelangen, dafs die Wiederholung jener älteren Versuche angezeigt erschien.

Die Herstellung der Prefssäfte geschah in der jetzt üblichen Weise. Die frisch aus dem Schlachthaus bezogenen Organe und ebenso die Hefezellen wurden mit angefeuchtetem Quarzsand oder Carborundum zu einem gleichmäfsig-feinen Brei zerrieben und mittels der Buchnerschen Presse ausgeprefst. Die Reaktion der Prefssäfte war in der Regel schwach sauer oder schwach alkalisch. Von dem Prefssaft wurden meist 0,5 bis 2 ccm mit 4 bis 5 ccm des aus der Arterie strömenden Karotidenbluts vom Kaninchen (oder dem Blut aus der art. femoralis eines Hundes) in sterilen, gleich weiten Reagenzgläsern unter Schütteln zusammengebracht. Sobald nach Mischung des Prefssafts mit dem Blut deutliche Gerinnsel auftraten, wurde dieser Zeitpunkt als „Gerinnungszeit" verzeichnet. Da es sich herausstellte, dafs die „Gerinnungszeiten" des normalen Kaninchenbluts von Tier zu Tier innerhalb der weiten Grenzen von 3 bis 25 Minuten schwankten (beim Hunde zwischen 2 und 8 Minuten), wurde in der Mehrzahl der Fälle auch eine Kontrollbestimmung der „Gerinnungszeit" der unversetzten Blutprobe vorgenommen.

Obschon in erster Linie die Koagulation des Blutes Gegenstand der Untersuchung war, so sollen doch mehr gelegentliche Beobachtungen über die Veränderungen des bereits geronnenen Bluts, insbesondere über die „Fibrinolyse" und „Hämolyse" mit angeführt werden. Unter dem Auftreten von „Fibrinolyse" verstehe ich die nachträgliche Auflösung des Blutkoagulums, vorausgesetzt, dafs eine bakterielle Infektion mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte. Die „Hämolyse", der Hämoglobinaustritt aus den roten Blutkörperchen, war in den meistenFällen so augenfällig,

*) Inaug.-Dissert. Dorpat 1884.
**) Inaug.-Dissert. Dorpat 1885.
***) Inaug.-Dissert. Dorpat 1886.

dafs keine Zweifel entstehen konnten. War dies nicht der Fall, so wurde das abzentrifugierte Serum der betreffenden Probe kolorimetrisch mit dem Serum des unversetzten Blutes verglichen. Hierbei fand auch die Isotonie der Lösungen eingehende Berücksichtigung. In der nachstehenden Tabelle sind die „Gerinnungszeiten" vor und nach Zusatz des Prefssaftes zusammengestellt.

Tabelle I.

Prefssaftversuche in vitro.

Nr.	Prefssaft von	Blutart	Prefssaft ccm	Blut ccm	Gerinnungszeit	Fibrinolyse	Hämolyse	Norm. Gerinnungsz.	Besondere Bemerkungen
1	Rindsleber	Kaninchenbl.	1,0	4—5	sofort	+		7 ½′	
2	„	„	1,0	4—5	„			13′	
3	„	„	1,0	4—5	8′			13′	Prefssaft
4	„	„	1,0	4—5	sofort			7′	½h bei 100°
5	Hundeleber	„	0,5	4—5	„		+	23′	
6	„	„	1,0	4—5	„		+	23′	
7	Kaninchenleber	„	0,5	4—5	„		(+)	6′	
8	„	„	1,0	4—5	„		+	6′	
9	„	Hundeblut	1,0	4—5	„		+	3′	
10	Hammelembryoleber	Kaninchenblut	0,5	4—5	„		+	7′	
11	„	„	1,0	4—5	„		+	7′	
12	Kalbsembryoleber	„	0,5	4—5	„			5 ½′	
13	„	„	1,0	4—5	„			5 ½′	
14	Rindermilz	„	1,0	4—5	2′	+	+	20′	
15	„	„	0,5	4—5	16′		+!	16′	Prefssaft
16	„	„	1,0	4—5	16′		+!	16′	½h bei 100°
17	Hundemilz	„	0,5	4—5	sofort		+	21′	
18	„	„	1,0	4—5	„		+	21′	
19	Hundeniere	„	0,25	4—5	„		(+)		
20	„	„	0,5	4—4	„		+	22′	
21	„	„	1,0	4—5	„		+	22′	
22	Hundemuskel	„	0,5	4—5	„		+	15′	
23	„	„	1,0	4—5	„		+	15′	
24	„	Hundeblut	0,5	4—5	„		+	5′	
25	„	„	1,0	4—5	„		+	5′	
26	Kaninchenmuskel	Kaninchenblut	1,0	4—5	3′			12′	
27	Hundelunge	„	0,5	4—5	sofort		+	13′	
28	„	„	1,0	4—5	„		+	13′	
29	„	„	2,0	4—5	„		+	13′	

Nr.	Prefssaft von	Blutart	Prefs-saft ccm	Blut ccm	Gerin-nungs-zeit	Fibri-nolyse	Hämo-lyse	Norm. Gerin-nungsz.	Besondere Bemerkungen
30	Hammel-embryo-lungen	Kaninchen-blut	0,5	4—5	sofort		0	7′	
31	„	„	1,0	4—5	„		0	7′	
32	Rinderhirn	„	0,5	4—5	„			6′	
33	„	„	1,0	4—5	„			6′	
34	Stierhoden	„	0,5	4—5	„			15′	
35	„	„	1,0	4—5	„	+		15′	
36	Thymus v. Kalb	„	0,5	4—5	„			16′	
37	„	„	1,0	4—5	„			16′	
38	„	„	0,5	4—5	12′			15′	Chamber-
39	„	„	1,0	4—5	12′			15′	land-Filtr.
40	Knochen-mark v. Rind	„	0,5	4—5	sofort			16′	
41	„	„	1,0	4—5	„			16′	
42	Lymphdrüs. v. Rind	„	0,5	4—5	„			5′	
43	„	„	1,0	4—5	„			5′	
44	„	„	0,5	4—5	6′	0	0	6′	Chamber-
45	„	„	1,0	4—5	8′	0	0	6′	land-Filtr.
46	„	„	0,5	4—5	7′	0	0	5′	Prefssaft
47	„	„	1,0	4—5	8 ½′	0	0	5′	½ h bei 100°
48	„	„	0,5	4—5	15′	0	0	16′	Prefssaft
49	„	„	1,0	4—5	15′	0	0	16′	½ h bei 100°
50	Lymphdrüs. v. Hammel	„	0,5	4—5	sofort	0	0	7′	
51	„	„	1,0	4—5	„	0	0	7′	
52	„	„	1,0	4—5	1 ½′	0	0	7′	Prefss. 5′ b. 100°
53	„	„	1,0	4—5	7′	0	0	7′	Prefss. 10′ b. 100°
54	„	„	0,1	4—5	sofort	0	0	20′	
55	„	„	0,5	4—5	„	0	0	20′	
56	„	„	0,1	4	„	0	0		
57	„	„	0,25	4	„	0	0		
58	„	„	0,5	4	„	0	0		
59	„	„	1,0	4	„	0	0		
60	„	„	2,0	4	„	0	0		
61	„	Hundeblut	0,5	4—5	„			3′	
62	„	„	1,0	4—5	„			3′	
63	Hefe	Kaninchen-blut	0,25	4—5	3′				
64	„	„	0,5	4—5	1 ½′				
65	„	„	1,0	4—5	1 ½′			2 ½′	
66	„	„	2,0	4—5	4′			2 ½′	

Nr.	Prefssaft von	Blutart	Prefs-saft ccm	Blut ccm	Gerinnungs-zeit	Fibrinolyse	Hämolyse	Norm. Gerinnungsz.	Besondere Bemerkungen
67	Hefe	Kaninchenblut	0,5	4—5	1′			9′	
68	„	„	1,0	4—5	1′			9′	
69	„	„	1,0	4—5	7′			8′	Prefssaft
70	„	„	2,0	4—5	8′			8′	½ h bei 100

Aus dem Angeführten geht hervor, dafs die Prefssäfte der sämtlichen untersuchten Organe der verschiedensten Säugetierarten [Leber, Milz*), Niere, Muskel, Lunge, Hirn, Hoden, Thymus, Rückenmark, Lymphdrüsen] eine gerinnungsbeschleunigende Wirkung auf das extravaskuläre Blut ausüben. Die Versuche mit dem Prefssaft der Hefezellen weisen darauf hin, dafs diese Wirkung nicht nur der tierischen Zelle zukommt, sondern eine verbreitete Eigenschaft zertrümmerten Protoplasmas darstellt. Auch die embryonalen Zellen**) sind wirksam, wie die Versuche mit dem Leberprefssaft von Hammel- und Kalbsembryo sowie dem Lungenprefssaft von Hammelembryo dargethan haben. Man kann dieses Ergebnis, das eine Bestätigung und Erweiterung der von Alexander Schmidt und seinen Schülern mitgeteilten Befunde darstellt, auch folgendermafsen ausdrücken: Zertrümmertes Protoplasma enthält regelmäfsig ein gerinnungsbeförderndes Agens.

Hiergegen könnte man einwenden, dafs die gefundene Gerinnungswirkung von dem anhaftenden Blut der Organe herstammte. Der im gleichen Sinne ausfallende Versuch mit Hefezellen macht

*) In den Versuchen von Foà und Pellacani (a. a. O.) übte die Milz keinen gerinnungsbeschleunigenden Einfluss aus.

**) Die Frage nach der Blutgerinnung beim Embryo ist bisher noch nicht systematisch in Angriff genommen worden. Aus gelegentlichen Beobachtungen, die ich an Embryonen der verschiedensten Lebensalter und Spezies (Hammel, Rind, Schwein, Kaninchen, Meerschweinchen) angestellt habe, geht hervor, dafs die Blutgerinnung hier langsamer verläuft als beim erwachsenen Tier. Ich konnte mich sogar häufig davon überzeugen, dafs in einer Reihe von Fällen nur ein kleiner Anteil des nach dem Tode entnommenen Bluts eine überaus lockere Gerinnselbildung einging, während der überwiegend gröfsere dauernd flüssig blieb. Auch das Placentarblut des menschlichen Neugeborenen bewahrte in einigen Fällen zum weitaus gröfseren Teil seine flüssige Beschaffenheit. Es wäre allerdings noch zu untersuchen, ob nicht die faserstoffbildenden Substanzen in geringerer Menge als beim Erwachsenen im Blute der Embryonen und Neugeborenen vorkommen. C. Delezenne (zitiert nach Duclaux, Traité de Microbiologie 1898, t. I, p. 679) scheint übrigens schon ähnliche Befunde erhoben zu haben.

indessen diese Bedenken nicht wahrscheinlich. Auch die Thatsache, dafs der Blutgehalt der untersuchten Organe ein äufserst verschiedener, in manchen Fällen, wie bei den Lymphdrüsen, sehr gering war, spricht dagegen. Zur völligen Sicherstellung bedurfte es jedoch eines Versuches mit sorgfältig vom Blut befreiten Organen.

Zu diesem Zwecke liefs ich einem Kaninchen von 1850 g 6 Liter auf 37° erwärmter, 0,8 proz. Kochsalzlösung in die linke vena jugularis communis einlaufen. Aus der rechten vena jugularis flofs die durchgespülte Flüssigkeit. Die völlig blutleeren Organe wurden danach sofort zerkleinert, mit Quarzsand zerrieben und mit einer Muskelpresse ausgepreſst. Die so erhaltenen Preſssäfte der verschiedenen Organe wurden in folgender Weise mit Kaninchenblut im Reagenzglas zusammengebracht und die Gerinnungszeiten verzeichnet.

Preſssaft von	Blutart	Preſs-saft ccm	Blut ccm	Gerinnungs-zeit	Fibri-nolyse	Hämo-lyse	Normale Gerinnungszeit
Milz	Kaninchen-blut	0,5	4—5	sofort	0	0	16′
„	„	1,0	4—5	„	0	0	16′
Leber	„	0,5	4—5	„	0	0	16′
„	„	1,0	4—4	„	0	0	16′
Niere	„	0,5	4—5	„	0	0	16′
„	„	1,0	4—5	„	0	0	16′
Muskel	„	0,5	4—5	„	0	0	16′
„	„	1,0	4—5	„	0	0	16′
Lungen	„	0,5	4—5	„	0	0	16′
„	„	1,0	4—5	„	0	0	16′

Trotzdem also die Organe völlig entblutet waren, bewirkten die sämtlichen Preſssäfte sofortige, totale Gerinnung der einzelnen Blutproben. Bei den früheren Versuchen mit Preſssäften nicht entbluteter Organe war nur das sofortige Auftreten partieller Gerinnsel zu konstatieren, während bis zur völligen Gerinnung des Gesamtblutes einige Min. verstrichen. Wir werden später auf diesen Punkt näher eingehen.

Eine andere, nicht ohne weiteres zu lösende Frage ist die, ob die nachgewiesene Beschleunigung der Gerinnung von dem zertrümmerten oder aber dem lebenden Protoplasma herrührt. Da der Vorgang der Preſssaftgewinnung meist mehrere Stunden in Anspruch nimmt, ist hier reichlich Zeit gegeben, um eine in den Zellen vorhandene Vorstufe in die gerinnungsbeschleunigende Substanz überzuführen. Umgekehrt kann aber auch der Umstand, dafs die intakten Gewebe keine Gerinnung veranlassen, nicht als ein siche-

rer Beweis gegen die Präexistenz solcher gerinnungsbefördernder Substanzen in den lebenden Zellen angesehen werden; denn, wie weiter unten gezeigt werden wird, treten dieselben auch aus den abgestorbenen, intakten Zellen nicht in den spontan ausfliefsenden Gewebssaft über. So wahrscheinlich somit an sich die Vorstellung ist, dafs der gerinnungsbeschleunigende Stoff erst beim Absterben von zertrümmerten Zellen entsteht —, einen zwingenden Beweis dafür liefern meine Versuche nicht.

Was die weitere Charakterisierung der Substanz anlangt, so sind wir über das bereits Bekannte kaum hinausgekommen. Nach dem Vorgang von Alex. Schmidt wurde der Prefssaft von Rinderlymphdrüsen mit dem gleichen Volumen 96 proz. Alkohol versetzt, der Niederschlag getrocknet und in wenig Wasser aufgenommen: 0,1 bis 1,0 ccm der wässerigen Lösung bewirkten sofortige Koagulation von 4 bis 5 ccm Kaninchenblut, das normaler Weise erst nach neun Minuten gerann. Wurde der Prefssaft mit Tierkohle, Lykopodiumsamen oder Stärkepulver eine halbe Stunde lang anhaltend geschüttelt und danach durch ein Papierfilter filtriert, so war die Wirkung des klaren Filtrats nicht im mindesten herabgesetzt. Aus den Versuchsprotokollen (Tabelle I) geht ferner hervor, dafs der gerinnungsbeschleunigende Stoff bei fünf Minuten langem Erhitzen auf 100° an Wirksamkeit einbüfste, bei zehn Minuten langem Erhitzen auf 100° sie völlig verlor*), dafs weiterhin bei Filtration durch die Chamberlandkerze, die übrigens nur langsam erfolgte, die wirksame Substanz nicht in das Filtrat überging**). (Im Gegensatz hierzu blieb das Chamberlandfiltrat von Hundeblutserum wirksam.) Schon Wooldridge***) wies darauf hin, dafs das von ihm so bezeichnete Lymphfibrinogen nicht durch das Filter hindurchging, sobald feste Körper zugegen waren, welche die Filterporen verstopften. Der Zusatz von Ammoniumoxalat, der übrigens eine völlige Klärung des Prefssaftes der Hefezellen bewirkte, hob die Wirkung der sämtlichen Prefssäfte auf. Wenn ich z. B. 0,5 ccm einer 10 proz. Ammoniumoxalatlösung gleichzeitig mit 1,0 ccm äufserst wirksamem Prefssaft von Rinderlymphdrüsen zu 4 bis 5 ccm Kaninchenblut brachte, so blieb letzteres vollständig flüssig, auch dann, als ich nach 24 Stunden 0,5 ccm einer 10 proz. Calciumchloridlösung zufügte. Unter gewöhnlichen

*) Versuch 52 und 53.

**) Versuch 38 und 39; 44 und 45.

***) Wooldridge, Die Gerinnung des Blutes. (Herausgegeben von Frey.) Leipzig 1891. 17.

Bedingungen beschleunigt stets die Gegenwart von Calciumchlorid die Gerinnungswirkung der Preſssäfte.

Die wirksame Substanz der Preſssäfte widerstand nicht der Fäulnis: der Preſssaft von Rinderleber stand zwei Tage bei Zimmertemperatur. Im Ausstrichpräparat waren nach dieser Zeit zahlreiche Fäulnisbakterien nachweishar. Wurde 1,0 ccm dieses Preſssafts zu 4 bis 5 ccm Kaninchenblut hinzugefügt, so gerann das Blut erst nach 84, die Kontrollprobe nach 10 Minuten. Derselbe Preſssaft, der die Zeit über im Eisschrank gestanden hatte, bewirkte jedoch unter gleichen Bedingungen sofortige Gerinnung. In dem mit gefaultem Preſssaft versetzten Blut trat neben deutlicher Hämolyse auch Fibrinolyse auf, während unverdorbene Preſssäfte von Rinderlymphdrüsen weder Blut lackfarben machten, noch Fibrinolyse bewirkten. Die Frage, ob die gerinnungsbeschleunigende Substanz der frischen Preſssäfte ein Thrombin ist oder eine zymoplastische Substanz, d. h. ein Stoff, welcher Prothrombin in Thrombin überführt, wird durch die vorstehenden Versuche nicht entschieden. Da die Organpreſssäfte trüb zu sein pflegen, könnte man annehmen, daſs die Anwesenheit von Zelltrümmern die Gerinnungsbeschleunigung bewirkt. Demgegenüber ist aber zu bemerken, daſs auch die klar filtrierten und mit Tierkohle, Lykopodiumsamen oder Stärkepulver behandelten, völlig klaren Lösungen wirksam waren.

Schlieſslich möchte ich darauf hinweisen, daſs die Preſssäfte von Leber, Milz, Niere, Muskel und Lunge „hämolytisch“, ferner die von Leber, Milz und Hoden auch „fibrinolytisch“ wirkten. Sogar der eine halbe Stunde lang gekochte Preſssaft von Rindermilz bewahrte seine „hämolytische“ Eigenschaft. Dieser Befund läſst sich mit der Annahme, daſs in der Milz fermentartige Körper die „Hämolyse“ bedingen, nur schwer in Einklang bringen. Man darf daher vermuten, daſs die hämolytische Substanz des Preſssaftes der Rindermilz mit den nicht hitzebeständigen, globuliciden Stoffen der Blutsera nicht identisch ist.

2. Die Methodik der Autolyse.

Wie die Versuche von M. Jacoby und meine im hiesigen Institut ausgeführten Untersuchungen gelehrt haben, verläuft die Selbstverdauung der unter Fernhaltung von Bakterien bei 37° bis 40° gehaltenen Organe ungleich langsamer bei Anwesenheit von antiseptischen Stoffen (Toluol, Chloroform u. a.) als ohne dieselben. Möglicherweise bestehen überdies qualitative Unterschiede in betreff der gebildeten Produkte, da die einzelnen Antiseptika sich gegen die verschiedenen dabei wirksamen Fermente ungleich verhalten. Es empfiehlt sich daher, die „aseptische“ von der „anti-

septischen" Autolyse scharf zu unterscheiden. Die Versuche von Rindfleisch*), Tiegel**), J. Chiene und J. Cossar Ewarts***), Meissner†), G. Hauser††), Fr. Kraus†††) u. a. haben die experimentelle Möglichkeit erbracht, tierische Organe extra corpus steril zu verwahren. M. Jacoby*†) hat zuerst zum Zweck der Autolyse nach dem Vorgang von Fr. Kraus die Herausnahme von Leberstücken unter aseptischen Kautelen vorgenommen. Ich habe nun versucht, eine einfache und zuverlässige Methode für die aseptische Herausnahme der Organe in toto und ihre aseptische Autolyse auszuarbeiten.

Zu einem solchen Versuche ist aufser dem Operateur ein Assistent erforderlich. Das Versuchstier (Hund oder Kaninchen), das 24 Stunden gefastet hat, wird durch Chloroform oder Genickschlag getötet. Von dem Assistenten wird unmittelbar nach erfolgtem Tode die Haut von der Symphyse bis zum Jugulum freigelegt und möglichst weit zurückpräpariert. Die freigelegte Fläche wird mit Sublimat überspült und mit Sublimat durchtränkten Tüchern ringsum bedeckt. Der Operateur, der besser der Keimfreiheit seiner Hände mifstraut und sich der mit Sublimat sorgfältigst behandelten Gummihandschuhe bedient, eröffnet sogleich mit sterilisiertem Messer die Bauchhöhle und holt das betreffende Organ in toto heraus. Dieses wird sofort in ein bereit gehaltenes Gefäfs mit kochendem Wasser geworfen, der Deckel geschlossen und das Organ ein bis zwei Min. lang im kochenden Wasser gehalten. Mittels einer grofsen, sterilen Pinzette wird dann das Organ in ein zirka 10 Liter fassendes Gefäfs mit sterilisiertem, erkaltetem Wasser übertragen und von hier in eine grofse, sterile Doppelschale eingebracht. Vor der Sterilisation war in dieselbe ein kleines Glasgefäfs mit sublimatbefeuchteter Watte hineingestellt worden. Diese „sterile, feuchte Kammer" wird im Brutschrank bei 37° bis zum Ende der Autolyse verwahrt.

Beabsichtigt man, statt an Laboratoriumstieren die aseptische Autolyse an Organen der Schlachttiere vorzunehmen, so verfährt man zweckmäfsig folgendermafsen. Das betreffende Organ wird in toto herausgeschnitten und in ein verschliefsbares, mit 1 proz. Sublimatlösung gefülltes Gefäfs gebracht. Im Laboratorium wird das im Sublimat befindliche Organ mit sterilem Messer, wenn nötig, in kleinere Portionen zerteilt. Das Organ wird dann mittels steriler Pinzette in ein neues Gefäfs gebracht, welches zirka 10 Liter kochendes Wasser enthält. Nach ein bis zwei Minuten langem Aufenthalt im kochenden Wasser kommt das Organ in steriles, kaltes Wasser, dem vor dem Kochen Schwefelammonium oder Schwefelnatrium zugesetzt wurde; erneute Übertragung in sterilisiertes, kaltes Wasser u. s. w. wie oben. Nach Beherrschung

*) Virchows Archiv (1872). 54, 404.
**) Virchows Archiv (1874). 60, 455.
***) Journal of Anatomy and Physiologie (1878). 448.
†) Zitiert nach Rosenbach, Deutsche Zeitschr. f. Chirurg. (1880). 13, 344
††) Arch. f. experim. Path. u. Pharmak. (1886). 20, 162.
†††) Arch. f. experim. Path. u. Pharmak. (1887). 22, 174.
*†) a. a. O.

dieser Methode gelang es in den meisten Fällen, eine aseptische Autolyse der meisten tierischen Organe durchzuführen. Nur bei aseptischer Autolyse der Leber trat wiederholt eine Bakterienentwickelung auf, ohne dafs hier methodische Fehler untergelaufen wären. Weitere Untersuchungen werden dieser Beobachtung noch nachzugehen haben.

Die Keimfreiheit des autolysierten Organs wurde durch Verarbeitung gröfserer Mengen des ausgeströmten Saftes und der Organsubstanz zu Agar- und Gelatineplatten sowie durch Übertragung in 500 ccm gewöhnlicher und mit Paraffin überschichteter Bouillon sichergestellt. Die bakteriologische Untersuchung beschränkte sich aber nicht darauf, etwa erst nach mehrtägiger Autolyse die Prüfung des Keimgehaltes vorzunehmen. Vielmehr wurde schon in den ersten Stunden der Autolyse mit der Abimpfung begonnen und diese in mehreren Versuchsreihen systematisch von zwei zu zwei Stunden durchgeführt. Aus Versuchen, über welche ich anderen Ortes berichten werde, geht hervor, dafs bei Autolyse der Organe Substanzen entstehen, welche baktericide Eigenschaften besitzen. Trifft man nun nach mehrtägiger Autolyse keine Bakterien an, so ist keineswegs auszuschliefsen, dafs letztere von Anfang an nicht vorhanden gewesen seien. Vielmehr könnte die später auftretende baktericide Wirkung des autolysierten Organs eine anfänglich vorhandene Bakterienvegetation zerstört haben. Daher erscheint es geboten, die bakteriologische Untersuchung der Organe, welche der aseptischen Autolyse unterworfen werden, auch innerhalb der ersten 24 Stunden vorzunehmen. Für die Blutversuche kam fast durchgehends der reichlich ausgeströmte Saft des autolysierten Organs in Anwendung. In einigen Fällen wurde jedoch auch der Autolyserückstand des Organs durch die Buchnersche Presse ausgepreſst und der Preſssaft benutzt.

Was die antiseptische Autolyse der Organe anlangt, so folgten wir hier den bewährten Vorschriften, die von Salkowski und später von M. Jacoby angegeben wurden.

In der Mehrzahl der Fälle wurden 500 g des betreffenden, fettbefreiten Organs zerkleinert und mit 1000 ccm 0,6 proz. Kochsalzlösung versetzt. Dann ward so viel Toluol hinzugefügt, dafs nach tüchtiger Mischung eine zirka 5 ccm hohe Toluolschicht die Organflüssigkeit bedeckte. Bei längerem Aufenthalte im Brutschranke bei 37° mufste das Toluol öfters erneut und für gehörige Mischung desselben gesorgt werden. Vorteilhaft erschien uns auch die kombinierte Anwendung von Toluol und Chloroform: In einen Liter Organflüssigkeit giebt man zunächst zirka 30 ccm Chloroform, danach ebenso viel Toluol hinein. Die Organflüssigkeit wird dann von einer unteren Chloroform- und einer oberen Toluolschicht eingeschlossen. Da nun das Toluol die Tendenz hat, sich

in Chloroform zu lösen und umgekehrt, so werden beide Antiseptika durch die Organflüssigkeit hindurchdiffundieren, bis letztere mit ihnen gesättigt ist. Vor der schliefslichen Anwendung der filtrierten Organflüssigkeiten mufste noch das Antiseptikum im Vakuum bei zirka 35° entfernt werden.

Endlich möchte ich auf ein Verfahren aufmerksam machen, welches manche Vorzüge der aseptischen und antiseptischen Autolyse in sich vereinigt (kombinierte Methode der Autolyse). Man verfährt zunächst mit dem betreffenden Organ nach der bereits geschilderten Methode der aseptischen Autolyse und bringt es dann in eine Doppelschale hinein, welche Toluolwasser (bisweilen benutzte ich auch Senföl oder Zimtöl) enthält. Das Toluol besitzt keine erhebliche antiseptische Tiefenwirkung. Daher stört dasselbe nur wenig den autolytischen Prozefs, verhindert aber andererseits das Aufkommen von Bakterien. Allerdings ist man dann genötigt, vor Anstellung der Blutversuche das Toluol im Vakuum zu entfernen.

3. Das Auftreten eines gerinnungshemmenden Stoffes bei Autolyse der Organe und seine Verbreitung im Tierkörper.

Die Gröfse der autolytischen Kraft der Organe weist erhebliche Unterschiede auf. Ganz abgesehen von den Verschiedenheiten, welche sich für die einzelnen Tierspezies herausstellen, bestehen auch deutliche, individuelle Unterschiede, welche wohl durch Rassenunterschiede, Ernährungszustand, Alter, Geschlecht des Tieres und ähnliche Momente bedingt werden. Nimmt man die Schnelligkeit der Verflüssigung des Organbreies zum Mafsstab, so sind in absteigender Reihenfolge Pankreas, Lungen, Hoden, Lymphdrüsen, Muskel, Leber, Milz, Thymus, Knochenmark und Ovarien durch die Stärke ihrer autolytischen Kraft ausgezeichnet. Weiter wären noch zu nennen: Schilddrüse, Nebennieren, Dünndarm und Magen. Hingegen ist die Selbstverdauung von Nieren und Gehirn wenig beträchtlich. Ferner übertrifft das Verflüssigungsvermögen der embryonalen Organe bei weitem jenes des erwachsenen Tieres. Die Selbstverdauung („Autophagie") der Hefe schliefslich, die zuerst von A. Béchamp*), P. Schützenberger**), P. Schützenberger u. A. Destrem***) beobachtet und späterhin durch die Untersuchung Salkowskis†) und Kutschers††) weiter geklärt wurde, erreicht gleichfalls einen sehr ansehnlichen Grad. (Zu unseren Versuchen ver-

*) Compt. rend., tome 68, 645. **) Compt. rend., tome 68, 493. ***) Compt. rend., tome 88, No. 11.

†) Ztschft. f. physiol. Chemie 13, 506.

††) Ebenda 32, 59.

wandten wir ausschliefslich Prefshefe, die, mit gleichen Teilen Wasser versetzt, unter Chloroform bei 40° im Brutschrank gehalten wurde.) Bei der aseptischen Autolyse der Organe wird in der Regel schon innerhalb weniger Tage derselbe Verflüssigungsgrad erreicht, der bei der antiseptischen Autolyse erst nach mehreren Wochen erzielt wird. Es darf daher nicht wundernehmen, dafs bei dem aseptischen Verfahren der Abbau des Protoplasmas sowie die Bildung der autolytischen Spaltungsprodukte sich in der kürzesten Zeit vollzieht. Für die nachstehenden Blutversuche gelten die Bemerkungen, mit denen ich die Prefssaftversuche eingeleitet habe, mit einer Ausnahme. Bei den jetzt mitzuteilenden Versuchen wird als „Gerinnungszeit" der Endpunkt der Koagulation angegeben, welcher dadurch gekennzeichnet ist, dafs bei leisem Beklopfen des umgekehrten Reagenzglases die freie Fläche der Blutsäule sich nicht verändert.

A. Versuche mit antiseptisch autolysierten Organen.

In der nachstehenden Tabelle sind die einzelnen Versuche, die mit antiseptisch autolysirten Organen angestellt wurden, zusammengestellt.

(Siehe Tabelle II, S. 149 bis 152.)

Aus den mitgeteilten Versuchen ist zu entnehmen, dafs bei Autolyse von Lymphdrüsen, Ovarien, Hefezellen, Leber*), Milz, Schilddrüse, Pankreas, Dünndarm, Nebennieren und Thymus Substanzen auftreten, welche die Gerinnung des Blutes hemmen, eventuell völlig aufheben. Qualitativ gleich, aber weniger ausgesprochen war das Ergebnis bei Autolyse von Hoden, Muskel und Lungen. Hingegen war nach Autolyse von Hirn, Knochenmark, Magen und Nieren keine gerinnungshemmende Substanz zu erhalten.

Hierzu ist zu bemerken, dafs zwar der Magenfundus des Schweins, nach zweimonatlicher, unter Zusatz von Soda erfolgter Autolyse keine Blutwirkung äufserte, dafs aber eine in der üblichen Weise hergestellte Lablösung die Blutgerinnung zusehends hemmte. Wenn ich nämlich 1,0 ccm der Lablösung zu 4 ccm Hundeblut setzte, das normalerweise nach 3 Minuten gerann, so trat erst nach 45 Minuten

*) Die Blutwirkung der autolysierten Leber kann durch deren Gehalt an Galle ganz erheblich beeinflufst werden. Der Zusatz von 0,3 bis 1,0 ccm Galle (auch der mehrere Stunden lang gekochten) zu 4 bis 5 ccm Kaninchen- resp. Hundeblut genügt nämlich schon, um neben stärkster Hämolyse ein dauerndes Flüssigbleiben des Blutes zu bewirken [1]). Ist daher die autolysierte Flüssigkeit mit reichlichen Mengen von Galle vermischt, so wird die Hemmungswirkung nur verstärkt sein. J. v. Samson-Himmelstjerna (l. c.) giebt bereits an, dafs glycocholsaures und taurocholsaures Natrium die Blutgerinnung hemmt.

[1]) Diese Thatsache läfst sich mit der Theorie von Delezenne (Société de Biologie 1899, 28 octobre), wonach bei Auflösung der Erythrocyten gerinnungsbefördernde Stoffe entstehen, nicht in Einklang bringen.

Tabelle II.

Nr.	Organ	Blutart	Dauer der Autolyse	Extrakt ccm	Blut ccm	Gerinnungszeit	Fibrinolyse	Hämolyse	Normale Gerinnungszeit	Besondere Bemerkungen
1	Rindsleber	Kaninchenblut	8 Tage	0,5	4—5	45′	0	0	6′	
2	„	„	8 „	1,0	4—5	62′	0	0	6′	
3	„	„	43 „	1,0	4—5	23′	0			
4	„	„	6 Mon.	1,0	4—5	28′			5′	
5	„	Hundeblut	6 „	1,0	4—5	34′		0	3′	
6	„	Kaninchenblut	12 „	0,5	4—5	10′			4′	
7	„	„	12 „	1,0	4—5	30′			4′	
8	„	Hundeblut	12 „	0,5	4—5	11′			4½′	
9	„	„	12 „	1,0	4—5	13′			4½′	
10	Kalbsleber	Kaninchenblut	6 „	1,0	4—5	10′	0	0	6′	Blutserum bleibt völlig klar auch nach 5 Tagen
11	„	Hundeblut	6 „	1,0	4—5	5′	0	0	3′	
12	Schweineleber	Kaninchenblut	6 „	1,0	4—5	12′	0	0	6′	Blutserum bleibt völlig klar auch nach 5 Tagen
13	„	Hundeblut	6 „	1,0	4—5	13′	0	0	3′	
14	Hammelleber	Kaninchenblut	6 „	1,0	4—5	13′	0	0	6′	
15	„	Hundeblut	6 „	1,0	4—5	10′	0	0	3′	
16	Hundeleber	Kaninchenblut	8 Tage	0,5	4—5	25′	0		6′	
17	„	„	8 „	1,0	4—5	58′			6′	
18	„	„	14 „	0,5	4—5	28′			8′	
19	„	„	14 „	1,0	4—5	65′			8′	
20	„	Hundeblut	12 „	0,5	4—5	14′			4½′	
21	„	„	12 „	1,0	4—5	15′			4½′	
22	„	„	12 „	2,0	4—5	16′		+	4½′	
23	Embryo-Kalbsleber	Kaninchenblut	30 „	0,5	4—5	52′		(+)	6½′	
24	„	„	30 „	1,0	4—5	75′		(+)		
25	Rindermilz	„	10 „	0,5	4—5	15′	?			
26	„	„	12 „	1,0	4—5	4h	+	+		
27	„	„	12 „	2,0	4—5	4h	+	+		
28	„	„	36 „	1,0	4—5	2½h	?			
29	„	„	64 „	0,5	4—5	15′			7′	
30	„	„	64 „	1,0	4—5	∞ *)			7′	

*) ∞ bedeutet, daſs das Blut dauernd flüssig bleibt.

Nr.	Organ	Blutart	Dauer der Autolyse	Extrakt ccm	Blut ccm	Gerinnungszeit	Fibrinolyse	Hämolyse	Normale Gerinnungszeit	Besondere Bemerkgn.
31	Rindermilz	Kaninchenblut	9 Mon.	0,5	4—5	$4^1/_4$ h	+		7′	
32	„	„	9 „	1,0	4—5	20h		0	7′	
33	„	Hundeblut	12 Tage	1,0	4—5	15′	0	0	3′	
34	„	„	64 „	0,5	4—5	57′	+		4′	
35	„	„	64 „	1,0	4—5	∞		+	4′	
36	„	„	9 Mon.	0,5	4—5	25′			$4^1/_2$′	
37	„	„	9 „	1,0	4—5	62′		(+)	$4^1/_2$′	
38	„	„	9 „	2,0	4—5	20h		+	$4^1/_2$′	
39	Rindsmuskel	Kaninchenblut	11 Tage	1,0	4—5	17′				
40	„	„	12 „	1,0	10	62—92′			8′	
41	Stierhoden	„	8 „	2,0	4—5	$2^1/_4$h	?			
42	„	„	19 „	1,0	4—5	20′				
43	„	„	19 „	1,0	4—5	38′				
44	„	„	8 Mon.	0,5	4—5	$6^1/_2$h		+	7′	
45	„	„	8 „	1,0	4—5	7′		+	7′	
46	„	Hundeblut	8 „	0,5	4—5	15′		+	4′	
47	„	„	8 „	1,0	4—5	15′		+	4′	
48	Rinderhirn	Kaninchenblut	20 Tage	0,5	4—5	8′			6′	
49	„	„	20 „	1,0	4—5	9′			6′	
50	Rinderknochenmark	„	86 „	1,0	4—5	15′	0			
51	„	„	86 „	1,0	4—5	13′	0			
52	Kalbsthymus	„	7 „	0,5	4—5	2h	?		14′	
53	„	„	7 „	1,0	4—5	$4^1/_2$h	?		14′	
54	„	„	43 „	1,0	4—5	80′			11′	
55	Nebenniere v. Rind	„	103 „	0,5	4—5	180′	0		12′	
56	„	„	103 „	1,0	4—5	190′	0		12′	
57	Schilddrüse v. Schwein	„	10 „	1,0	4—5	2h	0		5′	
58	„	„	10 „	2,0	4—5	$2^1/_2$h	0		5′	
59	„	„	12 „	1,0	4—5	4h	0		8′	
60	„	„	8 Mon.	0,5	4—5	20′		+	7′	
61	„	„	8 „	1,5	4—5	56′		+	7′	
62	„	Hundeblut	8 „	0,5	4—5	122′			$3^1/_2$′	
63	„	„	8 „	1 0	4—5	125′			$3^1/_2$′	
64	Pankreas v. Rind	Kaninchenblut	48 Tage	0,5	4—5	30′			8′	
65	„	„	48 „	1,0	4—5	50′			8′	
66	„	„	48 „	2,0	4—5	∞			8′	

Nr.	Organ	Blutart	Dauer der Autolyse	Extrakt ccm	Blut ccm	Gerinnungszeit	Fibrinolyse	Hämolyse	Normale Gerinnungszeit	Besondere Bemerkungen
67	Pankreas v. Hund	Kaninchenblut	12 Tage	0,5	4—5	12′			7′	
68	„	„	12 „	1,0	4—5	22′			7′	
69	„	„	12 „	2,0	4—5	∞			7′	
70	„	Hundeblut	12 „	0,5	4—5	30′			4½′	
71	„	„	12 „	1,0	4—5	32′	+		4½′	
72	„	„	12 „	2,0	4—5	32′	+		4½′	
73	Rinderlymphdrüsen	Kaninchenblut	23 „	1,0	4—5	∞		+	20′	Nach 15′ kl. Gerinnsel.
74	„	„	23 „	1,0	4—5 + 3 Tropf. einer 10 proz. $CaCl_2$-Lösung	∞		+	20′	Nach 35′ kleines, partielles Gerinnsel.
75	„	„	42 „	1,0	4—5	∞		+	18′	
76	„	„	48 „	1,0	4—5	∞		+	12′	
77	„	„	6 Mon.	0,5	4—5	7′		+	7′	
78	„	„	6 „	1,0	4—5	7′		+	7′	
79	„	Hundeblut	36 Tage	1,0	4—5	24′		(+)	3′	
80	„	„	6 Mon.	0,5	4—5	15′		+	7′	
81	„	„	6 Mon.	1,0	4—5	52′		+	7′	
82	Rindsniere	Kaninchenblut	15 Tage	1,0	4—5	15′		+	12′	
83	„	„	15 „	1,5	4—5	16′		+	12′	
84	Hundeniere	„	10 „	0,5	4—5	2′		+	6′	
85	„	„	10 „	1,0	4—5	3′		+	6′	
86	„	„	12 „	0,5	4—5	2½′		+	4½′	
87	„	„	12 „	1,0	4—5	2½′		+	4½′	
88	„	„	16 „	0,5	4—5	10′		+	6′	
89	„	„	16 „	1,0	4—5	10′		+	6′	
90	„	Hundeblut	16 „	0,5	4—5	2′		+	3′	
91	„	„	16 „	1,0	4—5	2′		+	3′	
92	Schweinslunge	Kaninchenblut	11 „	0,5	4—5	50′		+	8′	
93	„	„	11 „	1,0	4—5	85′		+	8′	
94	„	„	11 „	1,5	4—5	89′		+	8′	
95	Ovarium einer Kuh	„	6 Mon.	0,5	4—5	20h		0	7½′	
96	„	„	6 „	1,0	4—5	∞		0	7½′	
97	„	„	6 „	2,0	4—5	∞		0	7½′	
98	„	Hundeblut	6 „	0,5	4—5	∞		0	4′	
99	„	„	6 „	1,0	4—5	∞		0	4′	
100	„	„	6 „	2,0	4—5	∞		0	4′	

Nr.	Organ	Blutart	Dauer der Autolyse	Extrakt ccm	Blut ccm	Gerinnungszeit	Fibrinolyse	Hämolyse	Normale Gerinnungszeit	Besondere Bemerkungen
101	Magenfundus v. Schwein	Kaninchenblut	2 Mon.	0,5	4—5	8′			7′	Autolyse unter Zusatz von Na_2CO_3.
102	„	„	2 „	1,0	4—5	9′			7′	
103	„	„	2 „	2,0	4—5	14′			7′	
104	Hefe	„	70 Std.	1,0	4—5	∞			12′	
105	„	„	70 „	2,0	4—5	∞			12′	
106	„	„	90 „	0,5	4—5	∞			6′	
107	„	„	90 „	1,0	4—5	∞			6′	
108	„	„	8 Tage	0,5	4—5	18h			9′	
109	„	„	8 „	1,0	4—5	∞			9′	
110	„	Hundeblut	90 Std.	0,5	4—5	$1\frac{1}{2}$h			3′	Von den Blutproben wird kein Serum ausgepreßt.
111	„	„	90 „	1,0	4—5	2h			3′	
112	„	„	90 „	2,0	4—5	$2\frac{1}{2}$h			3′	

feste Gerinnung ein; Labzymogen, das mir Herr Dr. Glaessner gütigst zur Verfügung stellte, hatte keinen hemmenden Einfluſs.

Bevor wir auf die mitgeteilten Versuche näher eingehen, seien erst die Experimente mit aseptisch autolysierten Organen nachstehend aufgeführt, damit dann die Ergebnisse der Versuche mit antiseptisch und aseptisch autolysierten Organen im Zusammenhange besprochen werden können.

B. Versuche mit aseptisch autolysierten Organen.

(Siehe Tabelle III, S. 153 bis 155.)

Aus den beigegebenen Tabellen II und III geht hervor, daſs in betreff der Endresultate zwischen den Versuchen mit antiseptischer und aseptischer Autolyse kein grundsätzlicher Unterschied besteht, wohl aber in Bezug auf den zeitlichen Verlauf. Durch die Anwesenheit der Antiseptika wird die Bildung der gerinnungshemmenden Substanzen derart verzögert, daſs es sich empfiehlt, ihr zeitliches Auftreten nur auf Grund der aseptisch ausgeführten Versuche zu beurteilen.

Die gerinnungshemmende Substanz ist von den ersten Tagen der Autolyse ab manchmal schon innerhalb der ersten 24 Stunden nachweisbar; ihre Menge, soweit sie sich nach der Wirkung schätzen läſst, nimmt dann langsam zu und erreicht nach einigen Tagen ein

Tabelle III.

Nr.	Organ	Blutart	Dauer der Autolyse	Extrakt ccm	Blut ccm	Gerinnungszeit	Fibrinolyse	Hämolyse	Normale Gerinnungszeit	Besondere Bemerkgn.
1	Rindsleber	Kaninchenblut	24 Std.	0,5	4—5	31′			14′	
2	„	„	24 „	1,0	4—5	46′			14′	
3	„	„	10 Tage	1,0	4—5	18 Std.			3′	
4	„	„	14 „	1,0	4—5	∞			5′	
5	Kaninchenleber	„	2 Std.	1,0	4—5	sofort		(+)	8′	
6	„	„	4 „	1,0	4—5	„		(+)	8′	
7	„	„	20 „	1,0	4—5	„	0	+	7½′	
8	„	„	20 „	1,0	4—5	2′	0		9′	
9	„	„	22 „	1,0	4—5	27′		+	7′	
10	„	„	24 „	1,0	4—5	40′		+	7′	
11	„	„	30 „	1,0	4—5	25′		+	7′	
12	„	„	96 „	1,0	4—5	50′		+	10′	
13	„	„	96 „	1,0	4—5	60′		(+)	6′	
14	„	Hundeblut	2 „	1,0	4—5	sofort		+	3′	
15	„	Meerschweinchenblut	20 „	1,0	4—5	∞		+		
16	„	„	20 „	1,5	4—5	∞		+		
17	Hundeleber	Kaninchenblut	2 „	1,0	4—5	sofort				
18	„	„	2 „	1,0	4—5	5′	0	+	8′	
19	„	„	2 „	1,0	4—5	3′	0	0	9′	
20	„	„	5 „	1,0	4—5	2′		+		
21	„	„	6 „	0,5	4—5	21′			10′	
22	„	„	6 „	1,0	4—5	21′		+	7½′	
23	„	„	16 „	1,0	4—5	∞		+	7½′	
24	„	„	20 „	0,5	4—5	15′		+		
25	„	„	22 „	0,5	4—5	26′			10′	
26	„	„	22 „	1,0	4—5	40′			10′	
27	„	„	24 „	1,0	4—5	30′				
28	„	„	24 „	1,0	4—5	sofort		0	6′	
29	„	„	25 „	1,0	4—5	∞			5′	
30	„	„	31 „	1,0	4—5	18 Std.			5′	
31	„	„	38 „	1,0	4—5	∞				
32	„	„	62 „	0,25	4—5	24 Std.			5′	
33	„	„	62 „	0,5	4—5	∞			5′	
34	„	„	62 „	1,0	4—5	∞			5′	
35	„	„	62 „	2,0	4—5	∞			5′	

Nr	Organ	Blutart	Dauer der Autolyse	Extrakt ccm	Blut ccm	Gerinnungszeit	Filtrolyse	Hämolyse	Normale Gerinnungszeit	Besondere Bemerkgn.
36	Hundeleber	Hundeblut	20 Std.	1.0	4—5	25′			3′	
37	„	„	38 „	1.0	4—5	„			3′	
38	„	„	38 „	1.0	4—5	„			2½′	
39	„	Meerschweinchenblut	16 „	1,0	4—5	„		+		
40	„	„	16 „	1,5	4—5	„		+		
41	„	„	16 „	2,0	4—5	„		+		
42	Hammelembryoleber	Kaninchenblut	17 „	0,5	4—5	23′	(+)		9′	
43	„	„	17 „	1.0	4—5	23′	+		9′	
44	Hundemilz	„	7 „	0,5	4—5	sofort		+	6′	
45	„	„	20 „	1,0	4—5	„				
46	„	„	24 „	0,5	4—5	„		+	6′	
47	„	Hundeblut	20 „	1,0	4—5	20′			3′	
48	„	Kaninchenblut	4 Tage	0,5	4—5	4 Std.			12′	
49	„	„	4 „	1.0	4—5	18 „			12′	
50	„	Hundeblut	8 „	0,5	4—5	18′			4′	
51	„	„	8 „	1,0	4—5	45′			4′	
52	Hundemuskel	Kaninchenblut	2 Std.	1.0	4—5	sofort		0		
53	„	„	2 „	1,5	4—5	„			7′	
54	„	„	5 „	1.0	4—5	2′		+!		
55	„	„	16 „	1,0	4—5	2′		+	7½′	
56	„	„	31 „	0,5	4—5	7½′			5′	
57	„	„	31 „	1.0	4—5	18 Std.		+	5′	
58	„	„	5 Tage	0.5	4—5	42′			16′	
59	„	„	5 „	1,0	4—5	45′			16′	
60	„	Meerschweinchenblut	16 Std.	1.0	4—5	2′		+		
61	„	„	16 „	1,5	4—5	2′		+		
62	Pankreas v. Rind	Kaninchenblut	4 „	1,0	4—5	9′			6′	
63	„	„	10 „	1,0	4—5	38′			6′	
64	Hundeniere	„	2 „	0,25	4—5	sofort		0	11′	
65	„	„	7 „	1,0	4—5	„		+!	6′	
66	„	„	9 „	1,0	4—5	„		+	15′	
67	„	„	16 „	1,0	4—5	„		+!	7½′	
68	„	„	4 Tage	1,0	4—5	14′		+!		
69	Hundelunge	„	2 Std.	0,25	4—5	sofort		0	6′	
70	„	„	16 „	1,0	4—5	2′		+!	7½′	
71	„	„	18 „	1.0	4—5	2½′		+	8′	

Nr.	Organ	Blutart	Dauer der Autolyse	Extrakt ccm	Blut ccm	Gerinnungszeit	Fibrinolyse	Hämolyse	Normale Gerinnungszeit	Besondere Bemerkgn.
72	Hundelunge	Meerschweinchenblut	16 Std.	1,0	4—5	2′		+		
73	„	„	16 „	1,5	4—5	2′		+		
74	Hammelembryodarm	Kaninchenblut	16 „	0,5	4—5	$7\frac{1}{2}$′			9′	
75	„	„	16 „	1,0	4—5	10′			9′	

Maximum. Bei sehr langer, viele Monate dauernder Autolyse ist dann oft wieder eine Abnahme bis zum vollständigen Verschwinden erkennbar. Die beträchtlichen, in den einzelnen Versuchen zu Tage tretenden Unterschiede lassen keine schärfere Präzisierung meiner Befunde zu.

Erwähnt sei, dafs bei Autolyse der Kaninchenleber nach 22 Stunden (Tab. III, Vers. 9), der Hundeleber nach 16 Stunden (Tab. III, Vers. 23) ein gerinnungshemmender Faktor nachweisbar war. Bei der Hundemilz liefs sich nach 24 Stunden noch keine antithrombische Wirkung gegenüber Kaninchenblut (III, Vers. 46), wohl aber bereits nach 20 Stunden gegenüber Hundeblut wahrnehmen (III, Vers. 47). Ferner zeigte sich Hundemuskel nach 31 stündiger (III, Vers. 57), Pankreas vom Rind sogar nach 10 stündiger Autolyse wirksam (III, Vers. 63). Andererseits war selbst nach 12 Monate dauernder Autolyse von Rindsleber die gerinnungshemmende Wirkung des Organsaftes gegenüber Kaninchen- und Hundeblut deutlich (Tab. III, Vers. 6 bis 9). Bei 9 monatlicher Autolyse von Rindermilz war sogar die Antithrombinwirkung noch recht auffallend (Tab. II, Vers. 31, 32, 36 bis 38), desgleichen auch bei der Schilddrüse vom Schwein nach 8 monatlicher Autolyse (Tab. II, 60 bis 63). Demgegenüber ist hervorzuheben, dafs bereits nach 6 monatlicher Autolyse von Rinderlymphdrüsen ihre Antithrombinwirkung gegenüber Kaninchenblut (Tab. II, Vers. 77, 78) verschwunden, gegenüber Hundeblut noch erkennbar war (Tab. II, Vers. 80, 81). Ebenso hatte auch Stierhoden nach 8 monatlicher Autolyse seine Hemmungswirkung nur gegen Kaninchen-, nicht gegen Hundeblut eingebüfst (Tab. II, Vers. 44 bis 47). Dasselbe ungleiche Verhalten der beiden Blutarten war, wie bereits erwähnt, bei den Versuchen mit aseptisch autolysierter Hundemilz zu Tage getreten. Hieraus darf man wohl folgern, dafs das Hundeblut ein schärferes Reagens für den Nachweis der Antithrombinwirkung darstellt als das Kaninchenblut. Es mag daran erinnert sein, dafs die Hemmungswirkung, welche nach der Injektion von „Pepton“ auftritt, nur beim Hund, nicht beim Kaninchen in Erscheinung tritt.

C. Einfluſs der Reaktion.

Einen sehr wesentlichen Einfluſs auf Bildung und Verschwinden des Antithrombins dürfte die Reaktion des in Autolyse begriffenen Organs ausüben. Im allgemeinen ist die Reaktion der auf aseptischem und antiseptischem Wege gewonnenen Flüssigkeiten schwach bis deutlich alkalisch. Eine Ausnahme bilden Leber, Muskel und Darm, welche meist bald saure Reaktion annehmen. Während Hundeleber bei aseptischer Autolyse bei 37° nach zwei Stunden noch alkalisch, nach sechs Stunden bereits sauer reagierte, wies Hundemuskel, der anfänglich gleichfalls alkalisch reagierte, bisweilen schon nach fünf Stunden schwach saure Reaktion auf. Lunge endlich, die ebenso wie der Muskel und der aseptisch aufbewahrte Darm von Embryonen bei der Autolyse reichliche Mengen von Kohlensäure entwickelte, reagierte nach 14tägiger antiseptischer Autolyse sehr schwach sauer. Da bei den vorliegenden orientierenden Versuchen nicht von vornherein auf die Reaktion Bedacht genommen werden konnte, ist nachträglich nicht ohne weiteres zu entscheiden, inwiefern die Reaktion des Organbreis das Auftreten und Verschwinden der Antithrombinwirkung beeinfluſst hat. Daſs hier jedoch sehr auffällige Unterschiede bestehen können, sei zunächst durch folgendes Versuchsprotokoll gezeigt, bei dem ich in der Lage war, von Herrn Dr. Glaessner zu anderen Zwecken hergestelltes Material für meine Versuche zu verwerten.

(Siehe Tabelle IV, S. 157.)

Aus dem Angeführten ist zu entnehmen, daſs bei Autolyse des Dünndarms ein Gehalt der Gesamtflüssigkeit an 0,36 Proz. HCl die gerinnungshemmende Wirkung nicht aufkommen lieſs. (Tab. IV, Vers. 9 bis 12; 21 bis 24.) Sobald jedoch diese Ansäuerung unterblieb, war die Antithrombinwirkung unverkennbar. (IV, Vers. 3 bis 4; 13 bis 14.) Am stärksten äuſserte sie sich, wenn vor der Autolyse so viel Natriumkarbonat zur Organflüssigkeit hinzugefügt wurde, bis eine deutliche alkalische Reaktion auftrat. (IV, Vers. 1 bis 2; 5 bis 8; 17 bis 20.) Hierzu ist allerdings zu bemerken, daſs z. B. bei Autolyse der Leber eine natürliche Säuerung erfolgte, ohne daſs durch diese das Entstehen eines Antithrombins verhindert worden wäre.

Der Einfluſs der Reaktion auf die Bildung des Hemmungsstoffes wird ferner durch den folgenden Versuch veranschaulicht. Von etwa zwei Monate alten Hammelembryo-Zwillingen wird die eine Leber ohne Zusatz, die andere, nachdem sofort nach der Herausnahme 1 ccm einer

Tabelle IV.

Nr.	Organ	Blutart	Dauer der Autolyse	Extrakt ccm	Blut ccm	Gerinnungszeit	Normale Gerinnungszeit	Besondere Bemerkungen
1	Duodenum v. Schwein	Kaninchenblut	14 Tage	0,5	4—5	2h	6′	Autolyse unter Zusatz von Na_2CO_3 und Toluol
2	„	„	14 Tage	1,0	4—5	3h	6′	
3	Dünndarm v. Schwein	„	40 Tage	0,5	4—5	11′	4′	Autolyse unter Chloroform
4	„	„	„	1,0	4—5	20′	4′	
5	Dünndarm v. Schwein	„	„	0,5	4—5	11′	4′	Autolyse unter Zusatz von Na_2CO_3 und Toluol
6	„	„	„	1,0	4—5	92′	4′	
7	„	„	„	0,5	4—5	16′	4′	Autolyse unter Zusatz von Na_2CO_3 und Chloroform
8	„	„	„	1,0	4—5	33′	4′	
9	„	„	„	0,5	4—5	4′	4′	Autolyse unter Zusatz von Toluol und 0,36 Proz. HCl
10	„	„	„	1,0	4—5	5′	4′	
11	„	„	„	0,5	4—5	4′	4′	Autolyse unter Zusatz von Chloroform und 0,36 Proz. HCl
12	„	„	„	1,0	4—5	4′	4′	
13	„	Hundeblut	„	0,5	4—5	38′	4½′	Autolyse unter Chloroform ohne Zusatz
14	„	„	„	1,0	4—5	60′	4½′	
15	„	„	„	0,5	4—5	16′	4½′	Autolyse unter Toluol; Chamberland-Filtrat
16	„	„	„	1,0	4—5	42′	4½′	
17	„	„	„	0,5	4—5	20h	4½′	Autolyse unter Chloroform und Zusatz von Na_2CO_3
18	„	„	„	1,0	4—5	∞	4½′	
19	„	„	„	0,5	4—5	20h	4½′	Autolyse unter Toluol und Zusatz von Na_2CO_3
20	„	„	„	1,0	4—5	∞	4½′	
21	„	„	„	0,5	4—5	10′	4½′	Autolyse unter Toluol und Zusatz von 0,36 Proz. HCl
22	„	„	„	1,0	4—5	17′	4½′	
23	„	„	„	0,5	4—5	15′	4½′	Autolyse unter Chloroform und Zusatz von 0,36 Proz. HCl
24	„	„	„	1,0	4—5	17′	4½′	

sterilen 10 proz. Natriumkarbonatlösung in ihr Parenchym unter aseptischen Kautelen injiziert wurde, 20 Stunden hindurch der aseptischen Autolyse unterworfen. Während 0,5 bis 1,0 ccm des autolytischen sauer reagierenden Saftes der ersten Leber 4 bis 5 ccm Kaninchenblut, dessen normale Gerinnungszeit 9 Minuten betrug, nach 25 Minuten zur Gerinnung brachten, übte der autolytische, stark alkalisch reagierende Saft der zweiten Leber keinen merklichen Einfluſs auf die Gerinnung aus. Nebenbei sei bemerkt, daſs der autolytische Saft der unter alkalischer Reaktion autolysierten Leber nach 16stündigem Verweilen im Eisschrank spontan gelatinös geronnen vorgefunden wurde, indes der saure, autolytische Saft der anderen Leber sich unverändert flüssig erhielt.

D. Gerinnungsbeschleunigung durch autolysierte Organe.

Wie aus den oben geschilderten Preſssaftversuchen hervorgeht, üben frische Organe eine gerinnungsbeschleunigende Wirkung aus. Bleibt nun diese Eigenschaft auch dem autolysierten Organ erhalten?

Eine Kaninchenleber wurde vier Tage lang der aseptischen Autolyse im Brutschrank bei 37° ausgesetzt. Nach dieser Zeit wurde der reichlich ausgeströmte Organsaft entnommen, und das autolysierte Organ, auf dessen Oberfläche sich Leucin- und Tyrosinkrystalle in reichlichster Menge ausgeschieden hatten, sofort mittels der Buchnerschen Presse ausgepreſst. Preſssaft wie ausgeströmter Organsaft wurden nun in gleicher Menge (0,5 bis 2,0 ccm) im Reagenzglas mit 4 bis 5 ccm Kaninchenblut zusammengebracht, das normalerweise nach 9 Minuten gerann. Während der Preſssaft *) augenblickliche Koagulation verursachte, gerann das mit dem Organsaft gemischte Blut erst nach 45 Minuten.

Eine Wiederholung des Versuches mit einer Kaninchenleber, die 96 Stunden der Autolyse unterworfen wurde, führte zu demselben Ergebnis; die Unterschiede waren hier sogar noch etwas erheblicher, indem mit dem Saft der autolysierten Leber versetztes Kaninchenblut nach 50 Minuten gerann, während der Preſssaft derselben autolysierten Leber die sofortige Blutgerinnung herbeiführte.

Hieraus darf geschlossen werden, daſs wenigstens eine kurze Autolyse des Organs die gerinnungsbeschleunigende Wirkung desselben keineswegs zerstört.

Aus diesen Versuchen ergiebt sich weiterhin eine groſse Ver-

*) Bei ruhigem, längerem Stehen sind an dem Preſssaft zwei Schichten, eine obere, klare und leicht flüssige und eine untere, trübe und schwer flüssige Schicht, unterscheidbar. Während 1,0 ccm der oberen Schicht (Preſssaft-Serum) zu 4 bis 5 ccm Kaninchenblut gebracht, erst nach 20 Minuten die Gerinnung eintreten lieſs, bewirkte die untere Schicht unter gleichen Voraussetzungen sofortige Koagulation des Blutes.

schiedenheit in der Art und Weise, wie die gerinnungsbefördernde und gerinnungshemmende Substanz aus dem Gewebe herausgespült wird. Obschon an sich wasserlöslich, geht die gerinnungserregende Substanz nicht in den Gewebssaft über, sondern wird mit grofser Zähigkeit von den Organelementen festgehalten, während die gerinnungshemmende Substanz leicht austritt. Es liegt nahe, dieses ungleiche Verhalten der beiden Stoffe mit dem Flüssigbleiben des Blutes im lebenden Organismus in Beziehung zu bringen. Endlich möchte ich nicht unterlassen, auf die besonders auffällige „Hämolyse", die nach Zusatz von autolysiertem Nieren-, Lungen-, Muskel- und Lymphdrüsensaft im Blute auftrat, die Aufmerksamkeit zu lenken (vgl. Tab. II). Auch scheint mir die Thatsache bemerkenswert, dafs in den mit dem Saft von autolysierter Leber von Kalb, Schwein und Hammel versetzten Blutproben das Serum selbst eine Woche hindurch völlig klar blieb, während das Serum der Kontrollproben nach mehrtägigem Stehen sich rötlich färbte. (Tabelle II, Vers. 10 bis 15.)

4. Eigenschaften der gerinnungshemmenden Substanz.

Es bedarf kaum des Hinweises, dafs durch die Bezeichnung „gerinnungshemmende" Substanz oder „Antithrombin" nichts darüber ausgesagt sein soll, ob es sich in meinen Versuchen allenthalben um ein und dieselbe Substanz, noch auch, ob es sich um ein Gemenge gleichartig wirkender Stoffe handelt. Vorläufig empfiehlt es sich, der Einfachheit wegen nur von einer Substanz zu sprechen, wenn auch mit Vorbehalt. Späterhin bliebe allerdings noch zu untersuchen, ob das „Antithrombin" die Wirkung des Thrombins oder der zymoplastischen Substanzen hemmt oder aufhebt.

1. Hitzebeständigkeit. Behufs Untersuchung, ob die gerinnungshemmende Substanz die Siedehitze verträgt, wurden die folgenden Versuche angestellt, die in tabellarischer Anordnung hier angeführt werden.

(Tabelle siehe S. 160.)

Die mitgeteilten Versuche führen zu dem übereinstimmenden Ergebnis, dafs die gerinnungshemmende Substanz durch Kochen nicht zerstört wird. Vielmehr gewinnt man den Eindruck, dafs die vorausgehende Erhitzung bei Siedetemperatur die Antithrombinwirkung obendrein verstärkt. Nur bei der autolysierten Thymus vom Kalb (Vers. 15, 16) sowie bei der Hefe (Vers. 30 bis 33) ist das Gegenteil ersichtlich.

Nr.	Organ	Blutart	Dauer der Autolyse	Dauer des Erhitzens	Flüssigkeit ccm	Blut ccm	Gerinnungszeit	Normale Gerinnungszeit
1	Rindsleber	Kaninchenblut	43 Tage	—	1,0	4—5	23′	
2	„	„	43 Tage	1h bei 100°	1,0	4—5	30′	
3	„	„	6 Mon.	—	1,0	4—5	28′	5′
4	„	„	6 Mon.	½h bei 100°	1,0	4—5	38′	5′
5	Hammelleber	„	6 Mon.	—	1,0	4—5	13′	6′
6	„	„	6 Mon.	½h bei 100°	1,0	4—5	18½′	6′
*7	Hundeleber	Hundeblut	38 Std.	—	1,0	4—5	∞	3′
8	„	„	38 Std.	2′ bei 100°	1,0	4—5	∞	3′
9	Rindermilz	Kaninchenblut	36 Tage	—	1,0	4—5	2½h	
10	„	„	36 Tage	1h bei 100°	1,0	4—5	5h	
11	„	Hundeblut	9 Mon.	—	1,0	4—5	62′	4½′
12	„	„	9 Mon.	2 mal aufgek.	1,0	4—5	20h	4½′
13	Stierhoden	Kaninchenblut	19 Tage	—	1,0	4—5	20′	
14	„	„	19 „	1h bei 100°	1,0	4—5	38′	
15	Kalbsthymus	„	43 „	—	1,0	4—5	80′	
16	„	„	43 „	1h bei 100°	1,0	4—5	19′	
17	Rinder-lymphdrüsen	„	23 „	—	1,0	4—5	∞	20′
18	„	„	23 „	½h bei 100°	1,0	4—5	∞	20′
19	„	„	23 „	1h bei 100°	1,0	4—5	∞	20′
20	„	„	23 „	2h bei 100°	1,0	4—5	∞	20′
21	„	„	23 „	5h bei 100°	1,0	4—5	∞	20′
22	Nebenniere v. Rind	„	103 „	—	1,0	4—5	190′	
23	„	„	103 „	1h bei 100°	1,0	4—5	30h	
24	Schilddrüse v. Schwein	Hundeblut	8 Mon.	—	1,0	4—5	56′	
25	„	„	8 Mon.	mehrfach aufgekocht	1,0	4—5	∞	
*26	Pankreas v. Rind	Kaninchenblut	4 Std.	—	1,0	4—5	9′	
27	„	„	4 Std.	mehrfach aufgekocht	1,0	4—5	41′	
28	Ovarium v. Kuh	Hundeblut	6 Mon.	—	1,0	4—5	∞	4½′
29	„	„	6 Mon.	1h bei 100°	1,0	4—5	∞	4½′
30	Hefe	Kaninchenblut	70 Std.	—	1,0	4—5	∞	
31	„	„	70 Std.	¼h bei 100°	1,0	4—5	75′	
32	„	„	90 Std.	—	1,0	4—5	∞	6′
33	„	„	90 Std.	½h bei 100°	1,0	4—5	40′	6′

Die mit * versehenen Versuche sind mit aseptisch autolysierten Organen angestellt worden.

2. Filtrierbarkeit durch das Chamberlandfilter. Weiterhin konnte gezeigt werden, dafs das Antithrombin der sämtlichen untersuchten autolysierten Organsäfte in wässeriger Lösung bereits bei 2 bis 3 Atmosphären Druck die Chamberlandkerze passierte, ohne Einbufse zu erleiden. Nur die autolysierte Hefe machte wiederum insofern eine Ausnahme, als bei ihr eine Abschwächung der Wirkung nach stattgehabter Filtration eintrat. Während nämlich 1,0 ccm von 80 Stunden lang autolysierter Hefe 4 bis 5 ccm Kaninchenblut dauernd flüssig erhielt, trat auf Zusatz von Chamberlandfiltrat derselben autolysierten Hefe unter sonst gleichen Bedingungen die Blutgerinnung nach $1^1/_2$ Stunden ein.

3. Adsorption durch pulverförmige Substanzen. Bei Schütteln der wässerigen Lösung von autolysierten Organen mit Tierkohle, Lykopodiumsamen oder Stärkepulver blieb das Filtrat wirksam. Dies entspricht auch der Thatsache, dafs der bei Autolyse ganzer Organe in „steriler, feuchter Kammer" spontan abgeflossene Gewebssaft die Antithrombinwirkung aufwies.

4. Diffusibilität durch Membranen. Das Verhalten des Antithrombins bei Dialyse durch Pergamentpapier sowie durch Schilfmembranen*) wird durch nachstehende Versuche erläutert.

Die autolytischen Organsäfte wurden unter aseptischen Bedingungen in je drei sterilisierte Schilfmembranen eingefüllt und gegen steriles destilliertes Wasser im Brutschrank bei 37° dialysiert. Die Aufsenflüssigkeit wurde täglich erneuert. Nach fünf Tagen vereinigte ich die entsprechenden Dialysate und engte sie auf dem Wasserbad bis auf das halbe Volumen der ursprünglichen Menge des dialysierten autolytischen Saftes ein. Von dem eingeengten Dialysat sowohl wie von dem Dialyserückstand wurden dann abgestufte Mengen in der folgenden Weise mit Kaninchenblut zusammengebracht.

(Tabelle siehe S. 162.)

Ferner wurde auch das Verhalten bei Dialyse durch Pergamentpapier geprüft.

250 ccm Milzsaft vom Rind, der $2^1/_2$ Monate bei 37° autolysiert worden war, wurde 6 Tage lang nach Zusatz von Senföl gegen stehendes, mit Toluol versetztes destilliertes Wasser dialysiert. Danach nahm ich die bis zur Trockne eingeengte Aufsenflüssigkeit in 75 ccm 0,8 proz. Kochsalzlösung + 75 ccm destillierten Wassers auf. Die Flüssigkeit wurde durch die Chamberlandkerze filtriert. Von dem Filtrat bewirkten 1 resp. 2 ccm das dauernde Flüssigbleiben von je 4 bis 5 ccm Kaninchenblut, welches normalerweise nach 12 Minuten gerann.

Aus den angeführten Versuchen ist ersichtlich, dafs das Antithrombin eine dialysierbare Substanz darstellt.

*) Vgl. diese Beiträge 1, 80.

Nr.	Organ	Blutart	Dauer der Autolyse	Blut ccm	Art und Menge des Zusatzes	Gerinnungszeit	Normale Gerinnungszeit
1	Rindsleber	Kaninchenblut	30 Tage	4—5	1 ccm Dial.-Rückstand	3′	3′
2	„	„	30 „	4—5	2 „ „	5′	3′
3	„	„	30 „	4—5	1 „ Dialysat	20′	3′
4	„	„	30 „	4—5	2 „ „	27′	3′
5	„	Hundeblut	30 „	4—5	1 „ „	31′	4′
6	„	„	30 „	4—5	1,5 „ „	35′	4′
7	Lymphdrüsen v. Rind	Kaninchenblut	2 Mon.	4—5	1 „ „	21′	3′
8	„	„	2 „	4—5	2 „ „	40′	3′
9	Milch vom Rind	„	$1^1/_2$ „	4—5	1 „ Dial.-Rückstand	25′	5′
10	„	„	$1^1/_2$ „	4—5	2 „ „	27′	5′
11	„	„	$1^1/_2$ „	4—5	1 „ Dialysat	35′	5′
12	„	„	$1^1/_2$ „	4—5	1,5 „ „	39′	5′
13	„	Hundeblut	$1^1/_2$ „	4—5	1 „ „	29′	4′
14	„	„	$1^1/_2$ „	4—5	1,5 „ „	35′	4′
15	Hefe	Kaninchenblut	8 Tage	4—5	1 „ Dial.-Rückstand	3′	3′
16	„	„	8 „	4—5	2 „ „	6′	3′
17	„	„	8 „	4—5	1 „ Dialysat	12′	3′
18	„	„	8 „	4—5	2 „ „	40′	3′

Endlich liefs sich feststellen, dafs der sofortige wie der spätere Zusatz von Calciumchlorid die Hemmungswirkung des Antithrombins nicht schmälerte.

Wenn ich nämlich $^1/_2$ ccm autolytischen Saft einen Monat lang autolysierter Rinderlymphdrüsen gleichzeitig mit 0,1—1 ccm 10proz. Calciumchloridlösung zu 5 ccm Kaninchenblut setzte, so blieb letzteres dauernd flüssig. Es machte auch keinen Unterschied, als ich zu dem mit dem autolytischen Saft von Rinderlymphdrüsen versetzten Kaninchenblut nach einigen Stunden nachträglich Calciumchlorid hinzufügte: das Blut hielt den Faserstoff dauernd in Lösung. Ebenso vermochte auch 1 ccm durch aseptische, 38 stündige Autolyse erhaltener Saft von Hundeleber, trotz des Zusatzes von 0,05—1 ccm einer 10 proz. Chlorcalciumlösung, 5 ccm Kaninchenblut dauernd flüssig zu erhalten.

Alle diese Eigenschaften zeigen die Verschiedenheiten zwischen der gerinnungsbeschleunigenden Substanz der Prefssäfte und dem gerinnungshemmenden Produkt der Autolyse. Eine Scheidung dieser beiden Stoffe ist daher gut durchführbar. Einmal kann bei Gegenwart von Gewebselementen das Antithrombin durch wieder-

holtes Auswaschen der Gewebe ohne weiteres von dem Thrombin getrennt werden, da letzteres mit grofser Zähigkeit den Zellleibern anhaftet. Ferner kann man auch die gerinnungsbeschleunigende Substanz durch Erhitzen beseitigen und so den Hemmungsstoff isolieren.

Zur weiteren Charakterisierung des Antithrombins seien noch folgende Thatsachen angeführt. Bei behutsamem Einengen der wässerigen Lösung im Vakuum bis zur Syrupkonsistenz und nachfolgender Lösung des Trockenrückstandes in so viel Wasser, dafs die ursprüngliche Flüssigkeitsmenge wiederhergestellt ist, bleibt die Antithrombinwirkung erhalten. Aus ihrer wässerigen Lösung wird die wirksame Substanz durch 96 proz. Alkohol oder absoluten Alkohol vollständig gefällt, wie die folgenden Versuche lehren.

Das Filtrat von einen Monat lang bei 37° autolysierten Rinderlymphdrüsen, 1500 ccm, wird im Vakuum bei 35° auf 100 ccm eingedampft. Von dem Rückstand werden 20 ccm mit dem zehnfachen Volumen absoluten Alkohols versetzt, und 1. der Niederschlag, sowie 2. das Filtrat getrennt weiter verarbeitet.

1. Der entstandene flockige Niederschlag, der sich in Wasser nur unvollkommen löst, wird in wenig Wasser aufgenommen, von neuem mit absolutem Alkohol versetzt, abfiltriert und diese Prozedur im ganzen fünfmal wiederholt. Schliefslich wird der Alkohol auf dem Wasserbad verjagt und der alkoholfreie Niederschlag in 150 ccm destilliertes Wasser eingetragen. Wenn ich 1 ccm dieser Flüssigkeit, in welcher der gröfsere Teil des Niederschlages suspendiert blieb, mit 4 bis 5 ccm Kaninchenblut zusammenbrachte, so gerann letzteres erst nach 108 statt nach 20 Minuten. Bei Zusatz von 1,0 ccm des verdünnten Alkoholniederschlages zu 4 bis 5 ccm Hundeblut erfolgte die Koagulation nach 60 Minuten, statt, wie in der Kontrollprobe, nach 1 Minute.

2. Das Filtrat der mit dem zehnfachen Volumen absoluten Alkohols behandelten Lymphdrüsen wurde im Vakuum bis zur Trockne eingeengt, der Trockenrückstand mit 150 ccm destilliertem Wasser aufgenommen: 1 ccm des verdünnten Alkoholfiltrats brachte 4 bis 5 ccm Kaninchenblut nach 25 Minuten zur Gerinnung, während die Kontrollprobe nach 20 Minuten gerann. Bei gleichem Zusatz und unter sonst gleichen Voraussetzungen kam Hundeblut nach 6 Minuten zur Koagulation, indes die Kontrollprobe nach 5 Minuten gerann.

Aus diesen Versuchen, die noch durch eine Reihe ähnlicher Befunde gestützt werden könnten, geht bereits hervor, dafs der Hemmungsstoff aus seiner wässerigen Lösung durch absoluten Alkohol so gut wie quantitativ gefällt wird. Da nun der baktericid wirkende Körper, der, wie oben bereits erwähnt, bei Autolyse der Organe entsteht, nach unseren Versuchen in das Alkoholfiltrat übergeht, darf man folgern, dafs das Antithrombin und die

baktericide Substanz, die beide der Autolyse ihre Entstehung verdanken, nicht identisch sind.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dafs ein halbstündiges Kochen nach Zusatz von einproz. Essigsäure bis zum Auftreten neutraler Reaktion die Hemmungswirkung der autolysierten Lymphdrüsen nicht beseitigte.

Wenn ich nämlich den Alkoholniederschlag von autolysierten Rinderlymphdrüsen behufs Entfernung des Alkohols eine Stunde lang kochte, dann Essigsäure bis zu eben neutraler Reaktion hinzusetzte, $^1/_2$ Stunde lang wiederum kochte und nach dem Kochen sofort die durch Wasserzusatz verdünnte Flüssigkeit durch Hinzufügen von Natriumkarbonat alkalisch machte, so verzögerte 1 ccm derselben die Gerinnung von 4 bis 5 ccm Kaninchenblut bis zu $4^1/_2$ Stunden.

Schliefslich habe ich noch geprüft, ob das Antithrombin nach dem Hervorbringen einer einmaligen Wirkung aufgebraucht ist. Zu diesem Zweck brachte ich 1 ccm autolysierten Lymphdrüsensaft zu je 5 ccm Kaninchenblut. Das Blut blieb dauernd flüssig, und nach Senkung der roten Blutkörperchen setzte sich die rot gefärbte Kruorschicht scharf von der klaren, fast farblosen Plasmaschicht ab. Wenn ich nun 1 ccm der Plasmaschicht zu 4 bis 5 ccm Kaninchen- resp. Hundeblut, das normalerweise nach 15 resp. 4 Minuten gerann, hinzufügte, so fand die Gerinnung erst nach 40 resp. 25 Minuten statt. Hingegen bewirkte 1 ccm der Kruorschicht, sofern diese mehrmals mit 0,7 proz. Kochsalzlösung*) ausgewaschen und durch nachfolgendes Centrifugieren von der das Antithrombin enthaltenden Waschflüssigkeit befreit worden war, sofortige Koagulation von Hunde- und Kaninchenblut.

5. Die intravaskuläre Wirkung der Prefssäfte auf die Blutgerinnung.

In dem Vorausgegangenen haben wir die Beziehungen der frischen sowie der autolysierten Organe zur Blutgerinnung im Reagenzglas verfolgt. Die nächste Aufgabe war, die Versuche auch auf den Tierkörper auszudehnen. Die Einführung des lebenden Tierkörpers in das Experiment kompliziert die Bedingungen des letzteren in zum Teil unübersehbarer Weise. Nicht nur dafs hier die bekannten, aus der Verschiedenheit der Tiere sich ergebenden

*) Nach den Angaben von A. Gürber (Festschrift für Adolf Fick, Braunschweig 1899, S. 143) ist für Kaninchenblutkörperchen mindestens eine 0,56 proz. Kochsalzlösung nötig, damit dieselben gerade noch einige Stunden bestehen können.

Fehlerquellen hinzukommen, es sind auch die nicht zu beseitigenden Ungleichheiten der injizierten Lösungen in Betracht zu ziehen, welche zwar in vitro gegenüber der Hauptreaktion zurücktreten, im lebenden Tiere aber nicht vorherzusehende Störungen veranlassen können. So darf es auch nicht wundernehmen, dafs trotz der vorliegenden zahlreichen Untersuchungen *) keine übereinstimmenden Ergebnisse über die Beeinflussung der Blutgerinnung durch Injektion von Organflüssigkeiten, Zellen und Fermenten erzielt werden konnten. Ich möchte auf die Einzelheiten der älteren Versuche hier nicht eingehen, da mir auch die nachstehend mitgeteilten, eigenen Versuche nicht genügende Aufklärung gebracht haben, um die Abweichungen in den älteren Versuchen aufzuhellen.

Zunächst seien in Kürze die Versuche mit Preſssäften aufgeführt.

Die Versuchsanordnung gestaltete sich folgendermafsen. Den Versuchstieren, in der Regel Kaninchen, wurden aus der Carotis wenige Kubikcentimeter Blut entnommen und dessen normale Gerinnungszeit bestimmt. Sodann erfolgte die langsame Injektion des meist unfiltrierten Preſssaftes in die linke vena jugularis. Die Einlaufszeit betrug bei Mengen von 5 bis 10 ccm zirka vier bis acht Minuten. In bestimmten Zeitabständen, meist fünf Minuten nach beendeter Injektion, wurde aus der Carotis wieder Blut entnommen und der Endpunkt der Koagulation verzeichnet. Wenn durch den vorzeitigen Tod des Versuchstieres die Blutentnahme aus der Arterie vereitelt wurde, wurde sofort das Herz

*) Es seien hier nur folgende Autoren hervorgehoben: Alexander Schmidt (Du Bois' Archiv 1861, S. 565; 1862, S. 550; — Die Lehre von den fermentativen Gerinnungserscheinungen u. s. w., Dorpat 1876; — Ferner a. a. O.) und seine Schüler Francken (Inaug.-Diss., Dorpat 1979); Jacowicki (Inaug.-Diss., Dorpat 1875); Armin Köhler (Inaug.-Diss., Dorpat 1877); Edelberg (Arch. f. exp. Path. u. Pharmak., Bd. XII, S. 283); L. Birk (Inaug.-Diss., Dorpat 1880); J. Sachssendahl (Inaug.-Diss., Dorpat 1880); N. Bojanus (Inaug.-Diss., Dorpat 1881); F. Hoffmann (Inaug.-Diss., Dorpat 1881); Otto Groth (Inaug.-Diss., Dorpat 1884); v. Samson-Himmelstjerna (a. a. O.); A. Nauck (a. a. O.); Fr. Krüger (Zeitschr. f. Biolog. 1888, Bd. 24, S. 189) und E. v. Rennenkampff (Inaug.-Diss., Dorpat 1891); ferner: B. Naunyn (Arch. f. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 1, S. 1); Plosz und A. Györgyai (Arch. f. exp. Path. u. Pharmak., Bd. 2, S. 211); Wooldridge (a. a. O.; ferner: Du Bois' Archiv 1886, S. 397); J. Salvioli (Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1885, Nr. 51); Foà u. Pellacani (a. a. O.); H. Hildebrandt (Virchows Archiv 1890, Bd. 121, S. 1); R. Heidenhain (Pflügers Archiv 49, S. 209); Wright (Ref. Malys Jahresberichte 1892, S. 117; 1893, S. 141); Pekelharing (Deutsche med. Wochenschr. 1892, S. 1133 bis 1136; Ch. Contejean (Société de Biologie 1896, 11 juillet); Lilienfeld (a. a. O.)., Dastre und Floresco (Soc. de Biol. 1897, 31 juillet).

Tabelle V.

Nr.	Versuchstier	Injektionsmaterial	Menge der injizierten Flüssigkeit. ccm	Verhalten des Tieres nach der Injektion	Zeit der Blutentnahme nach beend. Injekt.	Gerinnungszeit	Sonstige Bemerkungen
1	Kaninchen von 1580 g	Leberpreſssaft vom Rind	9	Tier bleibt munter	4′	3h 50′ bis 5h 15′	Normale Gerinnungszeit = 12′
2	Kaninchen von 1587 g	Milzpreſssaft vom Rind	9	Sofortiger Tod unter Krämpfen	—	4h bis 20h	(Herzblut) Normale Gerinnungszeit = 9′
3	Kaninchen von 1130 g	Milzpreſssaft vom Rind	5	Anfangs munter. Nach 36 Std. Tod. Im Herzen u. in den groſsen Gefäſsstämmen dicke Gerinnsel	4′	2½h bis 3½h	(Carotisblut) Normale Gerinnungszeit = 15′
4	Kaninchen von 1650 g	Milzpreſssaft vom Rind (Chamberland-Filtrat)	10	Tier bleibt völlig munter	5′ 30′	6′ 9′	(Carotisblut) Keine Fibrinolyse, keine Hämolyse, normale Gerinnungszeit = 9′
5	Kaninchen von 1682 g	Milzpreſssaft vom Rind (½h bei 100°)	9	Anfangs munter. Nach 20 Std. Tod. Im Herzen u. in den groſsen Gefäſsstämmen dicke Gerinnsel	5′ 10′	20′ 60′	(Carotisblut) Normale Gerinnungszeit = 13′
6	Kaninchen von 1940 g	Nierenpreſssaft vom Kalb	8	Sofortiger Tod unter Krämpfen. Gerinnsel ganz besonders im Gebiet der Pfortader	—	∞	Carotis-, Herzblut u. Blut der vena cava bleiben flüssig
7	Kaninchen von 1785 g	Nierenpreſssaft vom Rind	7	Sofortiger Tod unter Krämpfen. Ganz besonders im Gebiet der Pfortader dicke Gerinnsel	—	∞	Carotis-, Herzblut u. Blut der vena cava bleiben flüssig
8	Kaninchen von 1830 g	Lungenpreſssaft vom Kalb	10	Sofortiger Tod unter Krämpfen	—	∞	Carotis-, Herzblut u. Blut der vena cava bleiben flüssig
9	Kaninchen von 1955 g	Gehirnpreſssaft vom Kalb	5	Sofortiger Tod unter Krämpfen	—	∞	Carotis-, Herzblut u. Blut der vena cava bleiben flüssig

Nr.	Versuchstier	Injektionsmaterial	Menge der injizierten Flüssigkeit. ccm	Verhalten des Tieres nach der Injektion	Zeit der Blutentnahme nach beend. Injekt.	Gerinnungszeit	Sonstige Bemerkungen
10	Kaninchen von 2240 g	Muskelpreſssaft vom Rind ($^1/_2{}^h$ bei 100°)	6	Tier bleibt munter	1′ 20′	9′ 9′	Normale Gerinnungszeit = 5′
11	Kaninchen von 1530 g	Muskelpreſssaft vom Rind (Chamberland-Filtrat)	5	Tier bleibt munter	1′ 20′	$1^1/_2$′ 13′	Normale Gerinnungszeit = 20′
12	Kaninchen von 1555 g	Hodenpreſssaft vom Stier	5	Tier anfangs munter, stirbt n. 10 Std. Gerinnsel im rechten Herzen, die sich in die vena cava fortsetzen	3′	$3^1/_2{}^h$	Normale Gerinnungszeit = 8′
13	Kaninchen von 1710 g	Lymphdrüsenpreſssaft vom Rind	6	Tier stirbt sofort unter Krämpfen	—	∞	Herzblut u. Blut der vena cava bleiben flüssig. Carotisblut gerann sofort
14	Kaninchen von 1780 g	Lymphdrüsenpreſssaft v. Rind ($^1/_2{}^h$ bei 100°)	8	Nach 10 Min. stirbt das Tier unter Krämpfen	1′ 10′	sofort sofort	Carotisblut Herz- u. Carotisblut
15	Kaninchen von 2265 g	Lymphdrüsenpreſssaft v. Rind (Chamberland-Filtrat)	9	Tier bleibt munter	5′	6′	Keine Fibrinolyse u. Hämolyse
16	Kaninchen von 1710 g	Lymphdrüsenpreſssaft vom Hammel	10 subkutan injiziert	Anfangs munter. Nach 24 Std. Tod des Tieres. Im Herzen in und den groſsen Gefäſsen dickes Gerinnsel.	30′	20′	Keine Fibrinolyse u. Hämolyse
17	Hund von 6500 g	Lymphdrüsenpreſssaft vom Rind	135 subkutan	Tier bleibt munter	3h 5h 12h 24h 48h	2′ 2′ $9^1/_2$′ 13′ $3^1/_2$′	Normale Gerinnungszeit = $3^1/_2$′
18	Kaninchen von 2010 g	Hefepreſssaft	8	Tier bleibt munter	5′ 15′ 30′ 20′	1′ 6′ 7′ 7′	Normale Gerinnungszeit = 7′

Nr.	Versuchstier	Injektionsmaterial	Menge der injizierten Flüssigkeit. ccm	Verhalten des Tieres nach der Injektion	Zeit der Blutentnahme nach beend. Injekt.	Gerinnungszeit	Sonstige Bemerkungen
19	Kaninchen von 2050 g	Hefepreſssaft ($^1/_2{}^h$ bei 100°)	8	Tier anfangs munter, stirbt nach 48 Std.	1′ 20′	sofort 6′	Normale Gerinnungszeit = 17′
20	Kaninchen von 2250 g	Hefepreſssaft (Chamberland-Filtrat)	10	Tier bleibt munter	1′ 20′ 40′	4′ 15′ 8′	Normale Gerinnungszeit = 8′

eröffnet und die Gerinnungszeit des Herzblutes verzeichnet. In denjenigen Fällen, in welchen das Blut sich innerhalb des Herzens flüssig erhielt, gerann es meist, sobald es ins Reagenzglas gebracht wurde. Diese schon Brücke*) bekannte Erscheinung hat ihn bekanntlich zu der Auffassung geführt, daſs ein von der normalen, lebenden Gefäſswand des Tieres ausgehender Einfluſs im stande sei, das Blut flüssig zu erhalten.

In der vorstehenden Tab. V sind die Versuche zusammengestellt.

Die angeführten Versuche sind weder zahlreich genug, noch auch unter so gleichartigen Bedingungen ausgeführt, um ein abschlieſsendes Urteil zu gestatten. So viel geht aber ohne weiteres hervor, daſs die Injektion gröſserer Mengen der gerinnungserregenden Substanz der Preſssäfte, ähnlich wie des Fibrinfermentes selbst, zumeist den Tod der Versuchstiere durch ausgedehnte Thrombosierung nach sich zieht. Man kann für einen Teil der Versuche geradezu die Anwesenheit von Fibrinferment in den Preſssäften für dieses Ergebnis verantwortlich machen.

Das Fibrinferment des Blutes ist aber nicht die alleinige Ursache, wie der folgende Versuch beweist, der bei seiner Wiederholung das gleiche Resultat zeigte.

Durch intravenöse Kochsalzinfusion wurden die Organe eines Kaninchens vollkommen entblutet. Von der blutleeren Leber wurde ein Preſssaft hergestellt und $3^1/_2$ ccm desselben einem Kaninchen von 1955 g in die Ohrvene injiziert. Nach fünf Minuten wurde aus der Carotis Blut entnommen: die Blutproben gerannen auf der Stelle. Zwei Minuten später trat der Tod des Tieres ein. Das aus dem Herzen entnommene, zum Teil noch flüssige Blut gerann im Reagenzglase augenblicklich, während das der vena cava entstammende Blut erst nach 40 Minuten zur Gerinnung gelangte. Im Herzen und den gröſseren Gefäſsstämmen waren zahlreiche Thromben vorhanden.

Obschon also hier von Blut und demnach auch von daher stammendem Fibrinferment befreiter Preſssaft benutzt wurde, er-

*) Brücke, Virchows Archiv 12 (1857), 81 u. 172.

folgte die intravaskuläre Gerinnung in einem solchen Umfange, dafs der Tod des Versuchstieres herbeigeführt wurde. Ebenso bewirkte auch Prefssaft, der seines Fibrinfermentgehaltes durch Kochen beraubt wurde, durch ausgedehnte Thrombosierung teils augenblicklich (Vers. 14), teils erst nach längerer Zeit (Vers. 5, 19) den Tod der Tiere.

Ein wesentliches Interesse beansprucht auch die — von Wooldridge*) zuerst mitgeteilte — Erscheinung, dafs das der sofortigen Gerinnung entgangene Blut ganz auffällig an Gerinnbarkeit einbüfst.

Dabei kommt vor allem die Beobachtung in Betracht, dafs das aus der Carotis der sterbenden Tiere strömende Blut sich in einem Teile der Fälle als schwer gerinnbar erwies (Vers. 6, 7, 8, 9), und dafs ferner dort, wo nicht Tod eintrat (Vers. 1, 2, 3, 12), sich vorübergehend eine intensive Gerinnungsverzögerung bemerkbar machte. Hierher gehört auch die Thatsache, dafs das aus dem Herzen und den grofsen Gefäfsstämmen entnommene Blut keine Gerinnung mehr zeigte. Man könnte zwar denken, dafs dieses Blut seines Fibrinogens bereits durch Fibrinbildung zum gröfsten Teile verlustig gegangen sei. Allein der folgende Versuch macht diese Annahme nicht wahrscheinlich.

Einem Kaninchen von 1680 g wurden 5 ccm Rinderlymphdrüsenprefssaft in die Ohrvene injiziert. Noch während der Einspritzung stirbt das Tier unter Krämpfen. Aus dem sofort eröffneten Herzen, in welchem sich keine Gerinnsel befinden, wird das flüssige Blut entnommen. Während sämtliche Proben desselben dauernd keine Gerinnung zeigten, gerannen 4 bis 5 ccm Blut sofort, wenn ich 0,5 bis 1,0 ccm Rinderlymphdrüsenprefssaft hinzufügte. Ebenso kam unter denselben Bedingungen auch das der vena cava entnommene Blut, welches an sich dauernd flüssig blieb, bei Zusatz desselben Prefssaftes auf der Stelle zur Gerinnung.

In denjenigen Versuchen, in welchen die Prefssäfte vorher durch die Chamberlandkerze filtriert wurden (Vers. 4, 11, 15, 20), bewirkten ihre Filtrate niemals eine intravaskuläre Gerinnung, welche den Tod des injizierten Tieres herbeigeführt hätte; wohl aber war in diesen Fällen nach erfolgter Einspritzung eine vorübergehende Gerinnungsbeschleunigung unverkennbar. Bei vorausgehender, kurzer Autolyse der Organe blieb deren Prefssäften auch ihre intravaskuläre Wirksamkeit erhalten.

Als ich von einer fünf Tage hindurch aseptisch autolysierten Kaninchenleber einen Prefssaft herstellte und 3 ccm desselben einem Kaninchen von 1530 g in die freigelegte vena jugularis einspritzte, so

*) a. a. O.

starb das Tier innerhalb weniger Minuten unter Krämpfen. Herz- und Carotisblut gerannen sofort im Reagenzglas, während das der vena cava entnommene Blut dauernd flüssig blieb und auffallend lackfarben war.

Entspricht die direkte Thrombenbildung sowie auch die beobachtete Gerinnungsbeschleunigung der von Wooldridge*) unterschiedenen, positiven Phase der Blutgerinnung, so kann man das Auftreten der Verminderung der Gerinnbarkeit der negativen Phase zur Seite stellen. Da die injizierten Preſssäfte nicht selbst merkliche Mengen von Hemmungsstoffen enthalten, so ist wohl die sekundär auftretende Gerinnungshemmung als eine vitale Reaktion aufzufassen, welche durch den Übertritt gerinnungshemmender Stoffe aus den Organen ins Blut zu stande kommt und mit dem Auftreten der „Peptozymimmunität“ und anderer Immunitätsformen verglichen werden kann.

6. Die intravaskuläre Wirkung der autolytischen Flüssigkeiten auf die Blutgerinnung.

Die Bemerkungen, welche ich betreffs der Versuchsanordnung bei den Injektionsversuchen mit den Preſssäften der Organe vorausgestellt habe, gelten auch für die folgenden Versuche. Die Organe wurden, wie bei den Versuchen in vitro, der aseptischen und antiseptischen Autolyse ausgesetzt. Der autolytische Organsaft war vor dem Gebrauch filtriert und eventuell das Toluol im Vakuum völlig weggeschafft worden. Die Einspritzung der autolytischen Flüssigkeiten erfolgte zum Teil wieder in die freigelegte vena jugularis, zum Teil auch in die Randohrvene; das Blut wurde in bestimmten Zeiträumen der Carotis entnommen.

(Siehe Tabelle VI, S. 171 bis 174.)

Die mitgeteilten Versuche bieten ein sehr wechselvolles Bild. In einer ganzen Reihe von Versuchen (Vers. 2, 9 bis 15, 18, 25, 34, 35) trat nach der Injektion des autolytischen Saftes von Hunde-, Kaninchen- und Rindsleber, von Milz, Muskel und Lymphdrüsen vom Rind sofort der Tod des Versuchstieres (Kaninchen) ein. Das Blut, das unmittelbar nach der Injektion aus der Carotis oder dem sogleich eröffneten Herzen entnommen wurde, kam in allen Fällen zur augenblicklichen Gerinnung. Nur bei dem Kaninchen, das mit dem Preſssaft von autolysierter Kaninchenleber behandelt wurde, war ein Flüssigbleiben des Blutes der vena cava sowie hochgradige Hämolyse desselben zu verzeichnen (Vers. 12). In einer Reihe von weiteren Versuchen veranlaſste die Injektion derselben autolytischen Säfte unter sonst gleichen Bedingungen keinerlei Erscheinungen, und die Gerinnung des nach fünf Minuten entnommenen

*) Proc. Roy. Soc. 1886, vol. 40, p. 134.

Tabelle VI.

Nr.	Tierart und Gewicht des Tieres	Injektionsmaterial und Dauer der Autolyse	Injektionsmenge ccm	Verhalten des Tieres nach der Injektion	Zeit der Blutentnahme p. i.	Gerinnungszeit	Sonstige Bemerkungen
1	Kaninchen von 1516 g	Hundeleber 2 Std. aseptisch autolysiert	3	Tod nach 10 Std. Im rechten Herzen u. Pulmonalgefäßen kleine Gerinnsel. Leber in toto deutlich lackfarben	5′ 10 h 10 h	17′ sofort ∞	Keine Hämolyse (Herzblut) (Blut der vena cava), bei letzterem hochgradige Hämolyse
2	Kaninchen von 1505 g	Hundeleber 16 Std. aseptisch autolysiert	3	Sofortiger Tod unter Krämpfen	—	sofort	Keine Hämolyse und Fibrinolyse
3	Kaninchen von 1590 g	Kaninchenleber 20 Std. aseptisch autolysiert	3	Tier bleibt munter	5′ 30′ 60′	30′ 12′ 10′	Keine Hämolyse und Fibrinolyse
4	Kaninchen von 1530 g	Hundeleber 24 Std. aseptisch autolysiert	5	Tod nach 24 Std. Im Herzen und grofsen Gefäßen Thromben	5′ 24 h	5′ sofort	Hämolyse deutlich (Herzblut)
5	Kaninchen von 1460 g	Kaninchenleber 24 Std. aseptisch autolysiert	4	Tod nach $2^1/_2$ Std. Sofort nach der Injektion Krämpfe tonisch-klonischer Art; beschleunigte unregelmäßige Respiration	10′ 30′ 60′ $2^1/_2$ h	sofort 4′ 4′ sofort	Keine Hämolyse und Fibrinolyse (Herzblut)
6	Hund von 6900 g	Hundeleber 38 Std. aseptisch autolysiert	8	Tod nach $^1/_2$ Std. Wegen Äthernarkose sonstige Erscheinungen nicht kontrollierbar	7′ $^1/_2$ h	12′ 2′	Keine Hämolyse und Fibrinolyse (Herzblut)
7	Kaninchen von 1420 g	Kaninchenleber 42 Std. aseptisch autolysiert	5	Tod nach $1^1/_2$ Std. unter dem Bild der Pikrotoxinvergift.	10′ 30′ 90′	4′ 39′ 19′	(Herzblut)
8	Kaninchen von 1360 g	Leber v. Rind 5 Tage antisept. autolysiert	7	Tier bleibt munter	5′	10′-20′	Keine Hämolyse
9	Kaninchen von 1510 g	Leber v. Rind 5 Tage antisept. autolysiert	10	Sofortiger Tod unter Krämpfen	—	sofort	
10	Kaninchen von 1230 g	Leber v. Rind 5 Tage antisept. autolysiert	10	Sofortiger Tod unter Krämpfen	—	sofort	Keine Fibrinolyse u. Hämolyse

Nr.	Tierart und Gewicht des Tieres	Injektionsmaterial und Dauer der Autolyse	Injektionsmenge ccm	Verhalten des Tieres nach der Injektion	Zeit der Blutentnahme p. i.	Gerinnungszeit	Sonstige Bemerkungen
11	Kaninchen v. 1165 g	Leber v. Rind 5 Tage antisept. autolysiert	3	Sofortiger Tod unter Krämpfen	—	sofort	
12	Kaninchen v. 1530 g	Kaninchenleber 4 Tage aseptisch autolysiert. Organ durch Buchnersche Presse ausgepreſst	3	Sofortiger Tod des Tieres	— —	sofort ∞	Carotis- und Herzblut (Blut der vena cava), bei letzterem hochgradige Hämolyse
13	Kaninchen v. 1501 g	Leber v. Rind 4 Monate antisept. autolysiert	4	Sofortiger Tod unter Krämpfen	—	sofort	
14	Kaninchen v. 1290 g	Leber v. Rind 4 Monate antisept. autolysiert	5	Sofortiger Tod unter Krämpfen	—	sofort	Keine Fibrinolyse u. Hämolyse
15	Kaninchen v. 1620 g	Leber v. Rind 4 Monate antisept. autolysiert	2	Sofortiger Tod unter Krämpfen	—	sofort	
16	Kaninchen v. 1580 g	Leberpreſssaft v. Rind 4 Mon. antisept. autolysiert	10	Tier bleibt munter	5′	13′	Keine Fibrinolyse u. Hämolyse
17	Kaninchen v. 1790 g	Milz v. Rind 6 Tage antiseptisch autolysiert	5	Tier bleibt munter	5′	20′	
18	Kaninchen v. 1590 g	Milz v. Rind 6 Tage antiseptisch autolysiert	5	Sofortiger Herzstillstand	—	sofort	
19	Kaninchen v. 1650 g	Milz v. Rind 13 Tage antiseptisch autolysiert	5	Tier bleibt munter	4′	24′ 7′	
20	Kaninchen v. 2010 g	Milz v. Rind-Preſssaft. 3 Monate antiseptisch autolysiert	7	Tier bleibt munter	5′	5′ 10′	Keine Fibrinolyse

Nr.	Tierart und Gewicht des Tieres	Injektionsmaterial und Dauer der Autolyse	Injektionsmenge ccm	Verhalten des Tieres nach der Injektion	Zeit der Blutentnahme p. i.	Gerinnungszeit	Sonstige Bemerkungen
21	Kaninchen v. 1670 g	Niere v. Rind 15 Tage antiseptisch autolysiert	8	Tier bleibt munter	5′	18′-23′	Fibrinolyse angedeutet
22	Kaninchen v. 2210 g	Nebenniere v. Rind 11 Tage antiseptisch autolysiert	9	Tier bleibt munter	2′	19′-35′	Keine Fibrinolyse
23	Kaninchen v. 1705 g	Schweinslunge 10 Tage antiseptisch autolysiert	10	Tier bleibt munter	5′	7′-10′	
24	Kaninchen v. 1630 g	Hirn v. Rind 18 Tage antiseptisch autolysiert	10	Tier bleibt munter	5′	16′-20′	Fibrinolyse angedeutet
25	Kaninchen v. 1650 g	Muskel v. Rind 11 Tage antiseptisch autolysiert	7	Sofortiger Tod unter Krämpfen	—	1′-2′	
26	Kaninchen v. 1290 g	Schilddrüse v. Schwein 11 Tage antiseptisch autolysiert	8	Tier bleibt munter	5′	25′-40′	Blut fließt auffallend langsam aus der Carotis
27	Kaninchen v. 1160 g	Thymus v. Kalb 7 Tage antiseptisch autolysiert (Chamberland-Filtrat)	30	Vorübergehende, unregelmäßige Respiration	5′	20′	Keine Fibrinolyse
28	Kaninchen v. 1525 g	Thymus v. Kalb 20 Tage antiseptisch autolysiert	5	Tier bleibt munter	5′	17′-25′	
29	Kaninchen v. 1522 g	Hoden v. Stier 8 Tage antiseptisch autolysiert (Chamberland-Filtrat)	30	Vorübergehende Respirationsbeschleunigung	5′	15′	

Nr.	Tierart und Gewicht des Tieres	Injektionsmaterial und Dauer der Autolyse	Injektionsmenge ccm	Verhalten des Tieres nach der Injektion	Zeit der Blutentnahme p. i.	Gerinnungszeit	Sonstige Bemerkungen
30	Kaninchen v. 1250 g	Hoden v. Stier 19 Tage antiseptisch autolysiert	8	Tier bleibt munter	5′	8′	Blut fließt auffällig langsam aus der Carotis
31	Kaninchen v. 1385 g	Hoden v. Stier 20 Tage antiseptisch autolysiert	5	Tier bleibt munter	5′	9′-29′	
32	Kaninchen v. 1275 g	Hoden v. Stier 20 Tage antiseptisch autolysiert	5	Tier bleibt munter	5′	16′-18′	Fibrinolyse angedeutet
33	Kaninchen v. 1760 g	Hoden v. Stierpreßsaft 4 Monate antiseptisch autolys.	8	Tier bleibt munter	5′	10′	Keine Fibrinolyse
34	Kaninchen v. 1930 g	Lymphdrüsen v. Rind 37 Tage antisept. autolys.	4	Sofortiger Tod unter Krämpfen	—	sofort	(Carotisblut)
35	Kaninchen v. 1980 g	Lymphdrüsen v. Rind 37 Tage antisept. autolys.	5	Sofortiger Tod unter Krämpfen	—	sofort	(Carotisblut)
36	Kaninchen v. 1850 g	Lymphdrüsen v. Rind 37 Tage antisept. autolys. Dialyse-Rückstand (10 Tage gegen Leitungswasser dialys.)	10	Tier bleibt munter	5′	8′-10′	
37	Kaninchen v. 1790 g	Lymphdrüsen v. Rind 43 Tage antiseptisch autolysiert	30 (subkutan)	½ Std. p. i. Auftreten v. Konvulsion., später tetanische u. klon. Krämpfe. Ruhige Interv. mit beschleun. Respirat., Reitbahnbeweg. nach rechts, Benommenheit, Vorwärtsstürmen. Tod nach 1 Std.	50′ 60′	sofort sofort	Keine Hämolyse (Herzblut)
38	Kaninchen v. 1845 g	Hefe 8 Tage antisept. autolys.	3	Tier bleibt munter	5′ 10′	5′ 3′	Keine Hämolyse

Blutes ging höchstens mit einer kaum merklichen Verzögerung vor sich. (Vers. 8, 16, 20, 23, 24, 30, 32, 33, 38.)

Bei einigen Organen (Kaninchenleber, Milz, Niere, Nebenniere vom Rind, Schilddrüse vom Schwein, Thymus vom Kalb, Hoden vom Stier) war eine geringe Verlangsamung der Blutgerinnung sogar ziemlich deutlich (Vers. 3, 17, 19, 21, 22, 26, 28, 31). Schliefslich erfolgte bei einer ganzen Zahl von Versuchen noch nachträglich, nach mehreren, bisweilen erst nach 24 Stunden der Tod des Versuchstieres (Vers. 1, 5, 6, 7, 37). Das unmittelbar nach Eintritt des Todes aus dem Herzen entnommene, meist noch flüssige Blut, das zuweilen spärliche Gerinnsel daneben aufwies, gerann im Reagenzglas sofort; nur in dem Versuch mit autolysierter Kaninchenleber (Vers. 7) kam das Herzblut erst nach 19 Minuten zur Gerinnung. Schliefslich blieb in dem Versuch mit autolysierter Hundeleber (Vers. 1) trotz Eintritt des Todes das Blut der vena cava flüssig und zeigte eine auffällige Hämolyse, ebenso in dem Versuch 12. Die geringe Gesetzmäfsigkeit dieser Experimente ist, ganz abgesehen von einer Erklärung der individuellen Schwankungen, darin begründet, dafs mit den injizierten Lösungen eine ganze Reihe von gänzlich unbekannten Stoffen in die Blutbahn gebracht werden, welche vermutlich sehr verschiedene toxische Wirkungen besitzen. Es sei hier nur darauf hingewiesen, dafs z. B. nach Injektion von Flüssigkeit aus autolysierter Kaninchenleber und autolysierten Rinderlymphdrüsen Krankheitsbilder auftraten, welche sonst von Krampfgiften, insbesondere dem Pikrotoxin, hervorgerufen werden (Vers. 5, 7, 37).

Im ganzen scheint die Einspritzung der autolytischen Organsäfte durchgehends zuerst von einer Beschleunigung der Gerinnung begleitet zu werden. Die Zeit, innerhalb deren diese Wirkung noch nachweisbar ist, unterliegt wohl grofsen Schwankungen, und es hat den Anschein, als ob die Menge des injizierten Stoffes hierbei einen nachhaltigen Einflufs ausübt.

Bei dem einen Versuch (Vers. 7) ist nach fünf Minuten, ja selbst nach zehn Minuten (Vers. 5) eine Beschleunigung der Gerinnung zu verzeichnen, in einem anderen (Vers. 1, 3) ist sie nach fünf Minuten, allerdings bei geringerer Injektionsmenge, völlig verschwunden.

Auf diese schnell vorübergehende Gerinnungsbeschleunigung, die in einigen Fällen durch den Tod des Versuchstieres jäh unterbrochen wird, folgt dann ein mehr oder minder ausgesprochenes Stadium der verlangsamten Blutgerinnung. Dieses kann wieder verschieden lange Zeit hindurch andauern, und entweder bei völligem Gesundbleiben des Tieres allmählich zur Norm zurückleiten (Versuch 3), oder aber bei später eintretendem Tod des Versuchstieres durch ein Spätstadium der beschleunigten Gerinnung abgelöst werden (Vers. 1, 4, 5, 6). Im ganzen erhält man hier den Eindruck, dafs der lebende Organismus auf die Einführung der gerinnungshemmenden Stoffe früher oder später mit einer

antagonistischen Reaktion antwortet, wie das ja übrigens betreffs der Peptozymimmunität bereits völlig sichergestellt ist. Die Schwierigkeit, die direkte Wirkung der beigebrachten Stoffe und die im Organismus ausgelöste Reaktion auseinander zu halten, läfst die Ausführung der Gerinnungsversuche am lebenden Tier zunächst minder aussichtsvoll erscheinen.

Wir haben schliefslich noch versucht, in Erfahrung zu bringen, ob die vorausgehende Behandlung des Versuchstieres mit autolytischen Flüssigkeiten das Verhalten seines extravaskulären Blutes diesen gegenüber in merklicher Weise verändert. Es galt demnach zu vergleichen, wie das extravaskuläre Carotisblut des betreffenden Tieres vor und nach der Injektion des autolytischen Saftes auf dessen Zusatz reagiert.

Ein Kaninchen von 1460 g erhält 4 ccm autolytischen Saft einer 24 Stunden hindurch aseptisch autolysierten Kaninchenleber in die freigelegte vena jugularis. Vor und nach der Injektion wird aus der Carotis Blut entnommen:

Vor der Injektion:

4 bis 5 ccm Blut + 0,5 ccm autol. Kaninchenleber gerinnen n. 31 Min.
4 „ 5 „ „ + 1,0 „ „ „ „ „ 82 „

10 Minuten nach der Injektion:

4 bis 5 ccm Blut gerinnen unmittelbar.
4 „ 5 „ „ + 1 ccm autol. Kaninchenleber gerinnen nach $3^1/_2$ Std. ganz locker und gelatinös.

30 Minuten nach der Injektion:

4 bis 5 ccm Blut gerinnen nach 4 Minuten.
4 „ 5 „ „ + 1 ccm autol. Kaninchenleber gerinnen nach 4 Std. ganz locker und gelatinös.

60 Minuten nach der Injektion:

4 bis 5 ccm Blut gerinnen nach 4 Minuten.
4 „ 5 „ „ + 1 ccm autol. Kaninchenleber gerinnen nach 5 Std. ganz locker und gelatinös.

Nach $2^3/_4$ Std., Tod des Tieres (das noch flüssige Blut dem sofort eröffneten Herzen entnommen):

4 bis 5 ccm Herzblut gerinnen sofort.
4 „ 5 „ „ + 1 ccm autol. Kaninchenleber bleiben dauernd flüssig.

Ein ähnliches Ergebnis liefert auch der folgende Versuch:

Ein Kaninchen von 1600 g erhält 3 ccm autolytischen Saft einer 22 Stunden hindurch aseptisch autolysierten Kaninchenleber in die Ohrvene.

Vor der Injektion wurde aus der Carotis Blut entnommen:

4 bis 5 ccm Kaninchenblut + 1,0 ccm autol. Kaninchenleber gerinnen nach 20 Minuten.

10 Minuten nach der Injektion:

4 bis 5 ccm Kaninchenblut gerinnen nach 15 Minuten.

4 „ 5 „ „ + 1,0 ccm autol. Kaninchenleber gerinnen nach 60 Minuten gelatinös.

60 Minuten nach der Injektion:

4 bis 5 ccm Kaninchenblut gerinnen nach 10 Minuten.

4 „ 5 „ „ + 1,0 ccm autol. Kaninchenleber gerinnen nach 92 Minuten ganz locker und gelatinös.

Noch deutlicher war das Resultat in dem nachstehenden Versuch. Ein Kaninchen von 1450 g erhält 5 ccm autolytischen Saft von 30 Stunden lang aseptisch autolysirter Kaninchenleber in die Ohrvene.

Vor der Injektion wird aus der Carotis Blut entnommen:

4 bis 5 ccm Kaninchenblut + 1,0 ccm autol. Kaninchenleber gerinnen nach 23 Minuten.

10 Minuten nach der Injektion:

4 bis 5 ccm Kaninchenblut gerinnen nach 4 Minuten.

4 „ 5 „ „ + 1,0 ccm autol. Kaninchenleber gerinnen nach 25 Minuten gelatinös.

30 Minuten nach der Injektion:

4 bis 5 ccm Kaninchenblut gerinnen nach 40 Minuten.

4 „ 5 „ „ + 1,0 ccm autol. Kaninchenleber bleiben dauernd flüssig.

60 Minuten nach der Injektion:

4 bis 5 ccm Kaninchenblut gerinnen nach 35 Minuten.

4 „ 5 „ „ + 1,0 ccm autol. Kaninchenleber bleiben dauernd flüssig.

Nach 90 Minuten Tod des Tieres:

4 bis 5 ccm Herzblut gerinnen nach 20 Minuten.

4 „ 5 „ „ + 1,0 ccm autol. Kaninchenleber bleiben dauernd flüssig.

Schliefslich möchte ich noch einen Versuch mitteilen, in welchem einem Hunde von 6900 g in Äthernarkose 8 ccm autolytischer Saft von 38 Stunden lang aseptisch autolysierter Hundeleber in die freipräparierte vena jugularis injiziert wurden. Vor der Injektion war aus der arteria femoralis Blut entzogen worden.

Vor der Injektion:

4 bis 5 ccm Hundeblut + 1,0 ccm autol. Hundeleber bleiben dauernd flüssig.

7 Minuten nach der Injektion:

4 bis 5 ccm Blut gerinnen nach 12 Minuten.

4 „ 5 „ „ + 1,0 ccm autol. Hundeleber bleiben dauernd flüssig.

30 Minuten nach der Injektion Tod (das noch flüssige Blut wird sofort nach Eintritt des Todes aus dem Herzen entnommen):

4 bis 5 ccm Herzblut gerinnen nach 2 Minuten.

4 „ 5 „ „ + 1,0 ccm autol. Hundeleber bleiben dauernd flüssig.

Aus dem Angeführten ist zu entnehmen, dafs durch vorausgehende Einspritzung des Saftes von autolysierter Kaninchenleber in das Gefäfssystem von Kaninchen deren Blut eine erhöhte Fähigkeit gewinnt, sich von der Hemmungswirkung der gleichen autolytischen Flüssigkeit in vitro beeinflussen zu lassen.

Die Verminderung der Gerinnungstendenz geht nicht nur aus der Verlängerung der Gerinnungszeit, sondern auch aus der Art des Gerinnungsprodukts hervor; in allen Fällen zeigte nämlich das geronnene Kaninchenblut ein auffallend lockeres, gelatinöses Gerinnsel. Bemerkenswerterweise gewährt somit hier die Vorbehandlung mit Hemmungsstoffen der autolysierten Organe keine Immunität gegenüber der eingespritzten Substanz, vielmehr wird die Empfänglichkeit des Organismus für dieselbe erhöht.

7. Zusammenfassung und Schlufsbemerkungen.

Die mitgeteilten Ergebnisse lassen sich in folgenden Hauptpunkten zusammenfassen:

1. Die aus parenchymatösen, tierischen Organen zu erhaltenden Prefssäfte wirken ohne Ausnahme auf das Blut gerinnungsbeschleunigend.
2. Dieselben Organe, bei 37° sich selbst überlassen (autolysiert), geben Lösungen, welche ausgesprochen gerinnungshemmend wirken.
3. Die gerinnungsbeschleunigende und die gerinnungshemmende Substanz sind wasserlöslich, durch Alkohol fällbar, aber in ihrem physikalisch-chemischen Verhalten sehr wesentlich verschieden.

Die beschleunigende Substanz:	Die hemmende Substanz:
wird durch Siedehitze unwirksam gemacht,	nicht beeinträchtigt,
haftet den Organelementen sehr fest an,	nicht an,
geht durch Membranen nicht oder doch äufserst träge,	diffundiert,
geht durch Chamberlandkerze nicht,	unvollständig,
wird durch Calciumchlorid in ihrer Wirkung verstärkt,	nicht beeinflufst.

4. Bei Einbringung in das Blut lebender Tiere vermögen beide Stoffe eine im entgegengesetzten Sinne verlaufende Reaktion des Tierkörpers auszulösen.

Die Thatsache, dafs die parenchymatösen Organe sowohl die Gerinnung befördernde, wie sie hemmende Stoffe zu liefern vermögen, läfst eine Beziehung derselben zur Blutgerinnung innerhalb und aufserhalb des Organismus vermuten. Ob diese Beziehung besteht, hängt in erster Linie davon ab, ob während des Lebens solche Stoffe von den Organen gebildet und an das zirkulierende Blut abgegeben werden. Was in dieser Hinsicht die gerinnungsbefördernden Stoffe anlangt, so habe ich oben die Frage, ob sie in den intakten Zellen vorgebildet sind, auf sich beruhen lassen. Aber selbst wenn man diese Annahme macht, ist ein Übertritt dieser Stoffe in die Blutbahn durch die angeführten physikalisch-chemischen Eigenschaften sehr unwahrscheinlich gemacht, wie er denn auch nicht einmal in den bei der Autolyse spontan abfliefsenden Gewebssaft statthat. Erst die mechanische Zertrümmerung der Gewebselemente verhilft ihnen zum Austritt. Die Analogie mit der von Alexander Schmidt vertretenen Anschauung, dafs die Blutgerinnung von dem Zerfall zelliger Elemente abhängt, liegt auf der Hand. Das aus der Ader fliefsende normale Blut gerinnt nicht deswegen, weil es gerinnungsbeschleunigende Stoffe aus den Geweben empfangen hat, sondern weil sich in ihm selbst ein Zerfall geformter Elemente vollzieht; und es ist bekannt, dafs dieser Zerfall von mechanischen Momenten beeinflufst wird. Andererseits wird so verständlich, wie pathologische Veränderungen*), wie insbesondere nekrotische Vorgänge im Organismus selbst Blutgerinnung auslösen können.

Im Gegensatz zu dem gerinnungsbefördernden Stoffe ist dem Hemmungsstoff seinen Eigenschaften nach der Weg in die Blutbahn offen. Es wäre zu erwarten, dafs, wenn er während des Lebens in den Organen stetig entstünde, das Blut normalerweise merkliche Mengen davon enthielte. Das ist aber nicht der Fall, wie man sich überzeugt, wenn man Blut koaguliert und die Hemmungswirkung der Filtrate prüft.

Wenn ich nämlich das in Alkohol aufgefangene körperwarme Blut von Hund, Pferd und Rind mit dem zehnfachen Volumen absoluten Alkohols versetzte, so konnte ich daraus unter den nämlichen Voraussetzungen, wie bei den oben geschilderten Versuchen mit autolysierten Rinderlymphdrüsen, keine gerinnungshemmende Substanz isolieren. Dieses Resultat läfst zwei Erklärungsweisen zu: einmal kann man, wenn man an der Anwesenheit von Antithrombin im Blut fest-

*) Vgl. C. Weigert, Über die pathologischen Gerinnungsvorgänge, Virchows Archiv, Bd. 79.

hält, annehmen, dafs es sich hier um verschwindend geringe, nicht nachweisbare Mengen handelt. Zu zweit ist es denkbar, dafs das im Blute zirkulierende Antithrombin ein intermediäres Stoffwechselprodukt darstellt, welches jedoch sofortigem, weiterem Abbau unterliegt. Übrigens hat auch Alexander Schmidt*) niemals die Anwesenheit des von ihm dargestellten, gerinnungshemmenden Cytoglobins und Präglobulins in dem aus der Ader fliefsenden Blut nachweisen können.

Bemerkenswerterweise geht sogar dem Blut die Fähigkeit ab, aus sich die Hemmungssubstanz zu bilden.

Das Carotisblut eines Hundes (etwa 500 ccm) wurde unter aseptischen Kautelen in einen grofsen, sterilen Kolben eingebracht und 14 Tage hindurch bei 37° gehalten, ohne dafs Bakterienentwickelung eintrat. Nach dieser Zeit war teilweise Auflösung des Blutkoagulums (Fibrinolyse), Austritt des Hämoglobins aus den roten Blutkörperchen sowie Bildung reichlicher Hämoglobinkrystalle eingetreten. Ich brachte nun 0,1 bis 2,0 ccm der gelösten Blutflüssigkeit einmal direkt, in einem weiteren Versuch nach halbstündigem Kochen zu 4 bis 5 ccm Hundeblut, das normalerweise erst nach fünf Minuten gerann. Im ersteren Fall bildeten sich augenblicklich Gerinnsel. Wenn jedoch die autolysierte Blutflüssigkeit eine halbe Stunde lang vorher gekocht wurde, so erfolgte bei späterem Zusatz die Koagulation des Blutes innerhalb der normalen Gerinnungszeit.

Indem somit dem Blut weder die Eigenschaft zukommt, Hemmungssubstanzen in nachweisbarer Menge aufzuspeichern, noch auch an ihrer Bildung teilzunehmen, unterscheidet es sich in dieser Beziehung sehr wesentlich von den Organen. Diese stellen die Bildungsstätte, vielleicht auch ein Depot der Hemmungsstoffe dar. Zur Stütze letzterer Behauptung möchte ich auf den bereits erwähnten Versuch verweisen, in welchem die Prefssäfte künstlich entbluteter Kaninchenorgane auf der Stelle eine totale Gerinnung des zugesetzten Kaninchenblutes einleiteten, während die Prefssäfte nicht entbluteter Organe nur eine partielle Koagulation bewirkten. Jene verstärkte Wirkung deutet darauf hin, dafs durch die vorausgehende gründliche Durchspülung der Organe mittels physiologischer Kochsalzlösung auch das leichter diffundierende und den Organelementen nicht anhaftende Antithrombin weggeschafft wurde, und somit nur die festhaftenden, gerinnungsbeschleunigenden Substanzen allein zur Geltung kamen.

Die Vorstellung, dafs der flüssige Zustand des lebenden Blutes von dem Zuströmen von Hemmungsstoffen abhänge, findet in den eben mitgeteilten Versuchen keine sichere Stütze. Anders steht

*) Alexander Schmidt, Zur Blutlehre, Leipzig 1892, S. 160.

es allerdings um die unter abnormen Bedingungen auftretende Ungerinnbarkeit des Blutes. Für die durch Injektion von „Pepton“ und anderen Peptozymlösungen*) veranlafste Ungerinnbarkeit ist die Beteiligung der Leber — bezw. auch anderer Unterleibsorgane — sichergestellt.

Man kann in diesem Falle daran denken, dafs die Peptozymwirkung zu einer Ausschwemmung des in der Leber vorgebildeten bezw. aufgespeicherten Antithrombins führt. Nun ist aber der hervorgehobene Unterschied in dem Verhalten des Prefssaftes der entbluteten und nicht entbluteten Leber zu gering, als dafs man sich dazu verstehen könnte, einen irgendwie beträchtlichen Gehalt der frischen Leber an Hemmungsstoffen anzunehmen. Ebenso äufsert auch der Prefssaft von Leber, der an sich gerinnungsbeschleunigend wirkt, nach vorausgegangenem Kochen keinen merklichen Einflufs auf die Gerinnung. Man gelangt daher zu der Vorstellung, dafs beim Peptonversuch gröfsere Quantitäten von Antithrombin erst unter dem Einflufs der Peptoninjektion (des Peptozyms) entstehen.

Freilich ergiebt sich hierbei eine sehr beträchtliche zeitliche Differenz. Während bei der Autolyse die Antithrombinwirkung erst etwa in 24 Stunden wahrnehmbar wird, macht sie sich nach der Peptoninjektion in wenigen Minuten geltend. Wenn es sich wirklich um dasselbe Antithrombin**) handelt, so kann der Vorgang, durch welchen es gebildet wird, nicht in beiden Fällen der gleiche sein. Die Schnelligkeit, mit welcher der Tierkörper auf die Zufuhr von „Peptozym“ reagiert, findet übrigens ein Seitenstück in dem oben hervorgehobenen Verhalten des Blutes nach Zufuhr von gerinnungsbefördernden Stoffen.

Das Auftreten von zwei auf das Blut antagonistisch wirkenden Substanzen bei der Autolyse erinnert vielfach an die Bildung von Antitoxinen. Es war in Hinblick darauf von Interesse, zu sehen, ob sich die beiden Stoffe in ihrer Wirksamkeit aufheben.

Zu diesem Zweck wurde der Prefssaft von Rinderlymphdrüsen mit dem Filtrat von einem Monat lang bei 37° autolysierten Rinderlymphdrüsen in folgenden Mengenverhältnissen im Reagenzglas zusammengebracht:

---

*) Die einschlägige Litteratur findet sich bei Spiro und Ellinger, Zeitschr. f. physiol. Chemie 1897, Bd. XXIII.

**) Für die Annahme, dafs das Pfortadergebiet vorzugsweise die Quelle des Hemmungsstoffs darstellt, scheint die folgende Beobachtung zu sprechen. In zwei Versuchen (Tab. VI, Vers. 1, 12), in welchen das Kaninchen in dem einen Fall sofort, in dem anderen nach 10 Stunden verendete, gerann das entnommene Herzblut auf der Stelle, während das Blut der vena cava völlig flüssig blieb und — nebenbei bemerkt — sehr stark lackfarben war.

Preſssaft von Rinderlymphdrüsen ccm	+	autolysierter Saft von Rinderlymphdrüsen ccm
0,5		4,5
1,0		4,0
1,5		3,5
2,0		3,0
2,5		2,5
3,0		2,0
3,5		1,5
4,0		1,0

Von dem gut durchgeschüttelten Gemisch wurde sogleich je 1,0 ccm zu 4 bis 5 ccm Kaninchenblut gebracht. Schon nach wenigen Augenblicken traten in sämtlichen Blutproben deutliche Gerinnsel auf.

Aus diesem Versuch, der bei seiner Wiederholung stets das gleiche Resultat ergab, geht die ungleich stärkere Wirksamkeit des Preſssaftes gegenüber dem autolytischen Saft des gleichen Organs zur Genüge hervor. Auch als ich unter sonst gleichen Bedingungen den Preſssaft von Rindsleber und den autolytischen Saft von Rinderlymphdrüsen in seiner Wirkung auf Kaninchenblut prüfte, stellte sich wiederum die Überlegenheit des Preſssaftes heraus. Letztere trat auch zu Tage, als ich den Preſssaft von Hefe mit dem autolytischen Saft von Hefezellen, bezw. mit dem autolytischen Saft von Rinderlymphdrüsen in abgestuften Mengen zusammenbrachte und diese Mischung auf Kaninchen- bezw. Hundeblut einwirken ließs. Dieses Verhalten spricht auch dafür, daſs die beiden Antagonisten verschiedene Angriffspunkte haben, wie das zum Beispiel für das Fibrinferment und den gerinnungshemmenden Stoff des Blutegels, welcher mit dem Antithrombin der Autolyse auch sonst Ähnlichkeit besitzt, ohnehin bekannt ist. Doch kann diese Frage erst mit Erfolg in Angriff genommen werden, wenn klargestellt ist, ob diese Substanzen ihre Wirkung auf das Thrombin bezw. Prothrombin, oder auf die zymoplastischen Substanzen ausüben.

XI.

Über das Verhalten der festen und flüssigen Fettsäuren im Fett des Neugeborenen und des Säuglings.

Von Dr. **F. Siegert**, Privatdozent der Kinderheilkunde.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

L. Langer*) stellte im Jahre 1881 das auffallende Überwiegen der festen Fettsäuren im Unterhautfett des Neugeborenen fest gegenüber dem Überwiegen der Ölsäure beim Erwachsenen. Knoepfelmacher**) erweiterte diesen Befund durch Untersuchungen über das Fett im Säuglingsalter und beim Erwachsenen und schlofs aus seinen allerdings nicht zahlreichen Analysen auf eine ganz regelmäfsige im ersten Lebensjahr erfolgende relative Zunahme der Ölsäure unter gleichzeitiger Abnahme der festen Fettsäuren. Durch das Überwiegen der festen Fettsäuren mit hohem Schmelzpunkt im ersten Lebensmonate glaubte er das Sklerem der Neugeborenen erklären zu können und zugleich den Grund für das Fehlen des Sklerems im späteren Säuglingsalter in dem zu dieser Zeit schon zu hohen Gehalt an Ölsäure gefunden zu haben.

Thiemich***) konnte auf Grund der Analyse des Fettes von etwa 20 Neugeborenen und Säuglingen allerdings der Anschauung Knoepfelmachers nicht beitreten. Das Fett eines Kindes von sechs Wochen zeigte eine Jodzahl von 59,2, eines 16wöchentlichen von 58,9, also viel höher, als Knoepfelmacher bis zu $10^1/_2$ Monaten beobachtet hatte; andererseits steht bei Thiemich ein Neugeborener mit der Jodzahl 49,2 einem achtmonatlichen Säugling mit 48,1 gegenüber. Auch beobachtete er zwei Fälle von Sklerem mit $3^1/_2$ Monaten bei Jodzahlen des Unterhautfettes von 53,2

*) Monatshefte f. Chemie 2, 382.

**) Knoepfelmacher, Jahrb. f. Kinderheilkunde 45, 177.

***) Thiemich, Zeitschr. f. phys. Chemie 26, 189.

resp. 53,3 und sieht eine regelmäfsige Veränderung der Fettsäuren und deren Bedeutung für das Zustandekommen des Sklerems im Sinne Knoepfelmachers nicht als genügend bewiesen an.

Zur weiteren Klarstellung der Sachlage habe ich die Jodzahl der höheren Fettsäuren, welche als Mafs für den Gehalt an Ölsäure gilt, an dem Unterhautfettgewebe von vier Frühgeburten, fünf Neugeborenen und 19 Kindern bis zum vollendeten ersten Lebensjahr sowie bei einem Erwachsenen festgestellt.

Diese Analysen mögen, in der folgenden Übersicht mit den bisher vorliegenden vereinigt, zu einer kurzen Betrachtung der Veränderungen dienen, welche das Unterhautfett des Menschen im ersten Lebensjahr erfährt.

Methodisches.

Das fein zerhackte Unterhautfett wurde mit Alkohol in steigender Konzentration bei etwa 40° C., schliefslich mit siedendem absol. Alkohol, dann mit Äther im Soxhletschen Apparat extrahiert, das Extrakt mit alkoholischer Kalilauge oder mit Natriumalkoholat verseift, die Seifenlösung gespalten, die Masse der neutral gewaschenen Fettsäuren gründlich getrocknet.

Zur Bestimmung der Jodzahl empfehle ich auf Grund zahlreicher Vergleiche mit Bestimmungen nach Hübl die alkoholische Jodmonochloridlösung nach C. Ephraim *). Auch erweist es sich als vorteilhaft, eine Natriumthiosulfatlösung von 48 auf 1000 statt 24 : 1000 herzustellen und den Titer mit Kaliumbichromat und Jodkalium nach Volhard zu bestimmen. Es entspricht alsdann 1 ccm Thiosulfat ziemlich genau 1ccm Jodmonochloridlösung resp. 24mg Jod. Haltbar ist die Ephraimsche Lösung so wenig wie die Hüblsche, aber sie ist sofort nach der Herstellung brauchbar. Die durch Titration gefundenen Jodzahlen differierten meist um höchstens 1,5. Die folgende Tabelle enthält stets den Mittelwert aus zwei bis vier Titrationen.

Nr.	Autor	Alter	Jodzahl	Ernährungszustand u. s. w.
		Frühgeburten:		
1	Siegert	Im 8. Mon.	49,4	Fett. Hat 5 Stunden gelebt.
2	„	„ 8. „	46,8	Fett. 7 Tage Brust.
3	„	„ 8. „	35,6	Mager. Drilling. 2 Tage alt. Sklerem.
4	„	„ 8. „	37,7	Bruder von Nr. 3. Ebenso 5 Tage Brust.

*) C. Ephraim, Zeitschr. f. ang. Chemie 1895, S. 254.

Nr.	Autor	Alter	Jodzahl	Ernährungszustand u. s. w.
		Neugeborene:		
5	Knoepfelmacher	—	40,1	?
6	Thiemich	—	38,8	?
7	„	—	41,8	?
8	„	—	42,2	?
9	„	—	44,8	?
10	„	—	47,0	?
11	„	—	49.2	?
12	Siegert	—	38,95	Fett.
13	„	—	42,2	Sehr fett.
14	„	—	43,7	Fett.
15	„	—	44,6	Sehr fett.
16	„	—	46,75	Fett.
		Säuglinge:		
17	Siegert	10 Tage	38,7	Atrophisch. Verdünnte Kuhmilch.
18	„	21 „	45,95	Ziemlich fett. Ebenso.
19	Knoepfelmacher	23 „	39,70	Mager? Sklerem.
20	„	25 „	38,53	Sehr fett. Sklerem.
21	Siegert	28 „	47,97	Mager. Verd. Kuhmilch.
22	„	28 „	48,7	Fett. „ „
23	Thiemich	1 Mon.	38,1	Mäfsig fett. Brust.
24	„	1 1/4 „	50,6	Atrophie. Malzsuppe, vorher verdünnte Kuhmilch.
25	„	1 1/2 „	48,1	Atrophie. Gem. Nahrung.
26	Knoepfelmacher	1 3/4 „	42,8	Sehr abgemagert.
27	„	1 3/4 „	50,3	Abgemagert.
28	Siegert	1 3/4 „	38,45	Sehr fett. Verd. Kuhmilch.
29	„	1 3/4 „	51,4	Ganz atroph. „ „
30	„	2 1/2 „	53,5	Sehr fett. „ „
31	„	3 „	41,5	Sehr fett. „ „
32	Thiemich	3 1/2 „	53,4	„Gut genährt", 3350 g. Brust u. 3 bis 4 Tage Zwieback mit Milch.
33	„	3 1/2 „	53,2	„Gut genährt", 3460 g. Malzsuppe. Sklerem.
34	„	3 1/2 „	53,3	„Zieml. gut ernährt." Sklerem. Zwiebackabkochungen.
35	„	3 3/4 „	58,9	Noch ziemlich fettreich. Muttermilch.
36	„	3 3/4 „	54,4	Halbmilch. 3500 g. Mäfsig gut genährt.
37	„	4 „	41,4	Ein Drittel Milch. „Mäfsige Abmagerung", 3140 g.
38	Siegert	4 „	55,2	Zieml. fett. Verd. Kuhmilch.

Nr.	Autor	Alter	Jodzahl	Ernährungszustand u. s. w.
39	Siegert	4 Mon.	55,9	Sehr fett. Verd. Kuhmilch.
40	Thiemich	4½ „	42,3	Ein Drittel Milch. 4470 g. Bedeutend abgemagert.
41	„	5 „	47,8	Fett. Gemischte Kost.
42	Siegert	5 „	46,5	Sehr fett. Verd. Kuhmilch.
43	„	5¼ „	50,0	Zieml. fett. „ „
44	Knoepfelmacher	6 „	51,0	Sehr fett.
45	Thiemich	6 „	47,0	Mager. Malzsuppe.
46	Siegert	6 „	51,47	Mager. Verd. Milch.
47	Thiemich	7 „	48,5	Fett. Verd. Milch.
48	Siegert	7 „	46,1	Extreme Atrophie. Verd. Milch. Schleim.
49	„	7 „	52,9	Sehr fett. Verd. Milch.
50	Thiemich	8 „	48,1	Abgemagert. Verd. Milch, vier Tage nur Wasser.
51	Siegert	9 „	51,7	Zieml. fett. Gemischte Kost.
52	„	9 „	57,8	Fett. Gemischte Kost.
53	„	10 „	61,6	„ „ „
54	Knoepfelmacher	10½ „	55,5	Sehr fett. ?
55	„	12 „	63,7	Atrophisch. ?
56	Siegert	12 „	61,0	Sehr fett. Gemischte Kost.
57	Knoepfelmacher	17 „	64,5	Ziemlich fett. Gem. Kost.
58	Siegert	Erwachsener	65,0	Mäfsig fett. Gem. Kost.

Auf Grund dieser Befunde läfst sich ein Bild von den zeitlichen Veränderungen gewinnen, welchen das Unterhautfett unterliegt.

Das Fett der Frühgeburten wies bei Nr. 1 und 2, kräftigen Kindern, relativ viel Ölsäure auf, aber innerhalb der für die Neugeborenen üblichen Grenzen. Die beiden sehr elenden Drillinge von weniger als 1800 g Gewicht und mit der niedrigsten bisher beobachteten Jodzahl zeigten bei sehr verminderter Körpertemperatur bald nach der Geburt Sklerem, welches bis zum Tode und darüber hinaus dauerte. 12 Neugeborene ergeben die schon von Thiemich festgestellte grofse Verschiedenheit der Jodzahl mit Differenzen von 38,8 bis 49,2, und fast identische Werte ergiebt das Fett der Säuglinge im ersten Lebensmonat.

Das Verhalten der Jodzahl in den einzelnen Monaten übersieht man am besten in folgender Tabelle (siehe S. 187).

Erst mit dem Eintritt in den 10. Monat erfolgt eine einschneidende Veränderung insofern, als die niedrigsten Jodzahlen mit einer einzigen Ausnahme 55 überschreiten und die höchsten sich fortschreitend der Jodzahl 65 des Erwachsenen nähern. Auch

Alter	Zahl der Fälle	Kleinste Jodzahl	Gröfste Jodzahl	Mittelwert
Neugeborene	12	38,8	49,2	43,36
1 Monat	7	38,1	48,7	42,5
2 Monate	6	38,45	51,4	46,9
3 Monate	2	41,5	53,5	47,5
4 Monate	8	41,5	58,9	53,2
5 Monate	3	42,3	47,8	45,5
6 Monate	4	47,0	51,47	49,9
7 bis 8 Monate	4	46,1	52,9	48,9
9 Monate	2	51,7	57,8	54,75
10 bis 11 Monate	2	55,5	61,6	58,55
12 Monate	2	61,0	63,7	62,35

erreicht bis zum 10. Monat nur eine maximale Jodzahl den kleinsten Mittelwert des letzten Vierteljahres.

Betrachtet man die Mittelwerte der einzelnen Vierteljahre auf Grund von 15, 15 und 6 Fällen mit Jodzahlen von 45,0 im ersten, 50,7 im zweiten und 50,85 im dritten Vierteljahr, so erkennen wir keine Veränderung von Bedeutung, da sie alle die maximalen Werte von 49,2 (Thiemich) für den Neugeborenen und 49,4 (Siegert) für die Frühgeburten nicht oder fast nicht übertreffen. Für das letzte Viertel des ersten Jahres dagegen ergiebt sich, allerdings auf Grund von nur vier Analysen, mit 60,3 eine mittlere Jodzahl, welche der der Erwachsenen von 64 bis 65 recht nahe steht. Mit dem Beginn des zweiten Lebensjahres erreicht dann das Unterhautfett seine definitive Zusammensetzung.

Schon die Thatsache, dafs Thiemich in zwei Fällen bei Jodzahlen von 53,3 und 53,2 und im Alter von $3^1/_2$ Monaten Sklerem beobachtete, beweist, dafs der Ölsäuregehalt des Unterhautfettes allein für das Zustandekommen des Sklerems nicht mafsgebend ist. Bis zum Ende des 8. Lebensmonates liegen die mittleren Jodzahlen tiefer, ohne dafs je so spät Sklerem zu stande käme. Andererseits fehlt dasselbe bei so viel niedrigeren Jodzahlen von Neugeborenen und Kindern in den ersten Lebensmonaten trotz rascher Flüssigkeitsverluste und niedriger Temperaturen. Auch der von Thiemich mit Knoepfelmacher betonte Einflufs des Ernährungszustandes auf den Ölsäuregehalt des Fettgewebes, derart, dafs dieser bei rascher Abmagerung wegen des schnellen Verschwindens der leicht oxydierbaren Ölsäure sich durch eine niedrige Jodzahl ausdrücken müfste, läfst sich bisher nicht allgemein feststellen. Die Jodzahlen von Nr. 24, 27, 29 sprechen

dagegen, ebenso die gleichen Jodzahlen bei Altersgenossen sehr verschiedenen Ernährungszustandes, z. B. Nr. 21 und 22 bezw. 44 und 46. Sicher ist dieser Einfluſs vorhanden, aber ebenso sicher kann er durch andere Verhältnisse unterdrückt werden.

Die bekannte und durch die Arbeiten von Munk*), Rosenfeld**), Winternitz***) u. s. w. festgestellte Wirkung des Nahrungsfettes erscheint mir dagegen in dem raschen Wechsel der Zusammensetzung des Unterhautfettes, wie er sich im letzten Viertel des ersten Jahres bei gemischter Kost vollzieht, eindeutig ausgedrückt.

Im übrigen möchte ich annehmen, daſs der Säugling mit groſser Zähigkeit an der ursprünglichen Zusammensetzung seines Fettgewebes festhält, bis etwa vom 10. Monat an die veränderte gemischte Nahrung an Stelle der früheren, einseitigen Milchnahrung tritt. Dafür spricht wenigstens das Gesamtergebnis der bisher ausgeführten Analysen, die allerdings, da sie sich zum Teil auf Säuglinge im Zustande schwerster Erschöpfung beziehen, einer Ergänzung auf Grund eines Materials in bestem Ernährungszustande dringend bedürfen.

*) Munk, Virch. Arch. 101, 91.

**) Rosenfeld, Verhandl. des XV. Kongr. f. innere Med. Berlin 1897.

***) Winternitz, Deutsch. med. Wochenschr. 1897, Nr. 30.

Kürzere Mitteilungen.

3. Zur Frage des Nucleohistons.

Vorläufige Mitteilung
von **Ivar Bang**, Christiania.

In einer vor kurzem erschienenen Mitteilung*) habe ich angegeben, dafs Lilienfelds Nucleohiston, d. h. die Abscheidung, die man aus dem Wasserauszug der Thymus durch Essigsäure erhält, ein Gemenge darstellt, das einerseits von einem Nucleoproteid, andererseits von einem Niederschlag gebildet wird, der aus Nucleinsäure und Histon besteht. Ich habe daraufhin die Existenz eines „Nucleohistons" im Sinne Lilienfelds und Kossels, das sich in Leukonuclein und Histon spalten liefse, bestritten. Diese Angaben haben seitdem insofern Bestätigung gefunden, als Huiskamp**) die Gegenwart von Nucleoproteid in dem „Nucleohiston" auch durch analytische Data sichergestellt hat.

Wenn trotzdem Huiskamp an dem Begriff des Nucleohistons im Sinne Lilienfelds und Kossels festhält, so liegt dies, wie ich seitdem gefunden habe, daran, dafs es ihm trotz wesentlich besseren Verfahrens bei der Darstellung doch nicht gelang, das „Nucleohiston" von allen eiweifsartigen Beimengungen zu befreien.

Die Darstellungsmethode des „Nucleohistons" ist nach Huiskamp die folgende. Das filtrierte und zentrifugierte Wasserextrakt der Thymus wird mit 0,1 Proz. Chlorcalcium gefällt. Den Niederschlag löst man in sehr verdünntem Ammoniak, filtriert und fällt aufs neue mit 0,1 proz. Chlorcalcium. Dieser Niederschlag ist das reine Nucleohiston, welches sich in Übereinstimmung mit Lilienfelds Angabe in Histon und Nuclein zerlegen läfst. Anstatt Chlorcalcium kann man auch andere Metallsalze, z. B. Kochsalz, verwenden. Dieses Salz habe ich schon vor Huiskamp zum gleichen Zwecke benutzt. Die Methode Huiskamps bietet aber wesentliche Vorteile gegenüber der meinen dar: Bei Anwendung von 0,1 Proz. Chlorcalcium bekommt man eine vollständige Fällung, während 0,9 Proz. Kochsalz die Substanz sehr unvollständig niederschlägt. Es läfst sich bei ihrer Anwendung leicht zeigen, dafs der Niederschlag alles Histon des Wasserextraktes enthält.

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 30, 508 f.
**) Daselbst 32, 145 f.

Solches nach Huiskamp dargestellte „Nucleohiston" zeigte mir nun in der That das Verhalten, wie es Lilienfelds Definition verlangt. Wurde es mit 0,8 proz. Salzsäure gespalten, so resultierte eine Lösung, welche alles Histon enthielt, und ein Bodensatz, welcher alle von Huiskamp angeführten Reaktionen gab, auch die Eiweifsreaktionen. Dafs es sich aber bei diesen Eiweifsreaktionen um eine Beimengung handelt, wurde schon dadurch wahrscheinlich, dafs das Nuclein, nochmals mit Alkali gelöst und mit Chlorwasserstoff gefällt, jetzt einen Niederschlag gab, der keine Eiweifsreaktionen mehr aufwies, während sich in der Lösung der Eiweifsrest nachweisen liefs.

Noch beweisender, weil ohne Zuhülfenahme eines irgend eingreifenden Reagens, läfst sich dieser Nachweis führen, wenn man Huiskamps Darstellungsverfahren etwas modifiziert. Wenn man nach Huiskamp die Calciumchlorid-Fällung in verdünntem Ammoniak löst und filtriert, zeigt das Filtrat, wie auch Huiskamp bemerkt, starke Opaleszenz. Läfst man es nun 24 bis 48 Stunden stehen, so trennt sich die Lösung in zwei Schichten, eine obere, ganz wasserklare, substanzarme, und eine untere, welche einen Niederschlag suspendiert enthält.

Einer brieflichen Mitteilung Huiskamps zufolge hat auch er gesehen, dafs die Lösung nach einiger Zeit ärmer an Substanz wird. Er hat deswegen die Filtration möglichst schnell vorgenommen.

Um diese Schwierigkeit zu umgehen, und da mir die von Huiskamp geübte Auflösung der Chlorcalciumfällung in Ammoniak möglicherweise zu eingreifend schien, habe ich dies Verfahren verlassen. Man kommt nämlich viel besser zum Ziele, wenn man die Lösung in 5- bis 10 proz. Kochsalzlösung vornimmt. Wenn man die so erhaltene stark opaleszierende Flüssigkeit filtriert, so erhält man ein ganz wasserklares, überdies an Substanz, darunter an Histon, sehr reiches Filtrat. Auf dem Filter bleibt eine schmierige Masse, welche offenbar aus Verunreinigungen besteht. Indessen enthält das Filtrat auch jetzt noch mehrere Substanzen. Zur weiteren Reinigung habe ich es dialysiert. Es bildet sich dabei eine reichliche, ganz weifse Fällung, während ein Körper in Lösung bleibt, welcher nicht mehr durch 0,1 Proz. Calciumchlorid fällbar ist, wohl aber durch Essigsäure. Sämtliches Histon findet sich im Niederschlag. Das Filtrat ist frei davon.

Die weitere Untersuchung geschah in folgender Weise. Der Niederschlag wurde in 5- bis 10 proz. Kochsalzlösung gelöst. Einen Teil der Lösung zersetzte ich mit 0,8 proz. Salzsäure und bekam einen reichlichen Niederschlag, der Xanthinbasen und Phosphorsäure enthielt. Alle Eiweifsreaktionen waren negativ. Er bestand folglich aus einer Nucleinsäure, und enthielt kein Nuclein. Die salzsaure Lösung enthielt reichlich Histon, das die fünf von mir als charakteristisch aufgestellten Histonreaktionen darbot*). Es liefs sich weiter leicht zeigen, dafs die Lösung nur Histon enthielt.

*) Huiskamp giebt an, dafs das Histon unvollständig von Ammoniak niedergeschlagen wird, wenn Ammonsalze dabei sind. Er hat deshalb die salzsaure Histonlösung dialysiert und dann erst mit Ammoniak gefällt. Ich

Die Chlorcalciumfällung aus dem Wasserextrakt der Thymus lieferte sonach, von Verunreinigungen abgesehen, nur Nucleinsäure und Histon. Hiermit ist auch für Huiskamps Nucleohiston die Abwesenheit eines echten Nucleins dargethan, und ich kann wohl neuerlich auf meinen früheren Ausspruch zurückgreifen: Lilienfelds und Kossels „Nucleohiston" ist keine einheitliche Substanz; das „Nucleohiston" besteht aus Nucleoproteid, Nucleinsäure und Histon, welche zusammen von Essigsäure niedergeschlagen werden. Man thäte wohl nach dieser Deduktion am besten, die Bezeichnung Nucleohiston ganz fallen zu lassen, wenigstens sofern sie besagen soll, dafs die fragliche Substanz aus einem Nuclein und Histon besteht.

Die Nucleinsäure und das Histon stellen dagegen sicher die Hauptmenge des von Lilienfeld und Huiskamp untersuchten „Nucleohistons" dar. Doch fehlt noch der endgültige Nachweis, dafs es sich in diesem Falle um eine vielleicht schon vorgebildete chemische Verbindung der Nucleinsäure und des Histons handelt. In dieser Richtung giebt die Untersuchung der nach Huiskamp durch Chlorcalciumfällung erhaltenen Substanz einigen Aufschlufs.

Geht man von der Lösung der Chlorcalciumfällung in 5- bis 10prozentiger Kochsalzlösung aus und sättigt mit Kochsalz, so erhält man einen reichlichen Niederschlag, der sich vollkommen in Wasser löst, bei Zusatz von Essigsäure oder einer Mineralsäure aber absolut keinen Niederschlag giebt. Er besteht ganz aus Histon. Die histonhaltige Lösung wurde mit Alkohol-Aether gefällt, der Niederschlag in Wasser gelöst, bis zu vollständiger Entfernung des Kochsalzes dialysiert und dann in zwei Portionen geteilt. Aus dem einen Teil wurde das Histon durch Ammoniak niedergeschlagen. Das Filtrat, mit Salpetersäure und Silbernitratlösung versetzt, gab einen deutlichen Niederschlag von Chlorsilber. Der andere Teil der Lösung wurde eingedampft, getrocknet und nach Zusatz von Alkali verascht. Der Rückstand enthielt Chlor. Hieraus kann man den Schlufs ziehen, dafs das Histon bei der Kochsalzausfällung mit Salzsäure oder einem Chlorid verbunden erhalten wird. Es läfst sich ferner zeigen, dafs diese Lösung des Histons nicht durch 0,1 Proz. Chlorcalcium niedergeschlagen wird.

Das mit Kochsalz gesättigte Filtrat giebt keine Eiweifsreaktionen, es wird ferner von Mineralsäuren und zum Teil auch von Essigsäure niedergeschlagen. Durch Ammoniumsulfat läfst es sich in zwei Fraktionen teilen, so dafs es den Anschein gewinnt, dafs hier zwei Nucleinsäuren vorliegen. Ihre Lösung wird nicht von 0,1 Proz. Chlorcalcium gefällt.

Dafs nach dem Gesagten weder das Histon noch die Nucleinsäure für sich von 0,1 Proz. Chlorcalcium niedergeschlagen werden, dafs ferner, wie zum mindesten sehr wahrscheinlich ist, die Nucleinsäure im Filtrate

---

habe das nicht bestätigen können. Das Histon wird bei Gegenwart von Chlorammonium vollständig niedergeschlagen. Enthält die Lösung nicht Ammonsalze, so bleibt der Niederschlag, wie ich schon früher angegeben habe, aus, wenn man einen Überschufs von Ammoniak auf einmal zusetzt.

als Alkaliverbindung vorkommt, spricht dafür, dafs das Histon und die Nucleinsäure im Wasserextrakte der Thymus miteinander verbunden vorkommen. Diese Auffassung wird auch dadurch gestützt, dafs man aus der 5 bis 10 Prozent Kochsalz enthaltenden Lösung beider Körper beim Zusatz von Essigsäure sowohl die Nucleinsäure als das Histon vollständig niederschlagen kann. Es ist nicht anzunehmen, dafs ein einfaches Gemenge dieser Körper quantitativ von Essigsäure niedergeschlagen würde. Völlig sicher ist jedoch die Sache nicht, und es wäre auf der anderen Seite befremdend, dafs sich die Verbindung bei Sättigung mit Kochsalz einfach zu Histon und Nucleinsäure (bezw. deren Salzen) umsetzte.

Ich behalte mir vor, auf diese Verhältnisse sowie auf die vermutliche Existenz zweier Nucleinsäuren und deren chemische Beschaffenheit demnächst näher einzugehen. Wenn ich die vorliegenden Befunde trotz ihrer Lückenhaftigkeit mitteile, so geschieht es, um der Meinung entgegenzutreten, dafs auf Grund der Versuche Malengreaus und Huiskamps an der Existenz des „Nucleohistons“ im Sinne Lilienfelds und Kossels auch weiterhin festgehalten werden kann.

XII.

Über die Bildung bakterizider Stoffe bei der Autolyse.

Von Dr. **H. Conradi,**

früherem Assistenten des hygienischen Instituts zu Strafsburg.

(Aus den Instituten für physiologische Chemie und für Hygiene und Bakteriologie in Strafsburg.)

Die Immunität des tierischen Organismus gegenüber pathogenen Organismen beruht auf der natürlichen oder erworbenen Fähigkeit, der von den Mikroben ausgehenden Schädigung, bedingt durch Entziehung lebenswichtiger Stoffe oder durch Bildung toxischer Substanzen, entgegenzuwirken. Gegen erstere Gefahr schützt er sich durch Wachstumshemmung oder Abtötung der eingedrungenen Krankheitskeime, der anderen Aufgabe wird er gerecht durch Überführung der giftigen Bakterienprodukte in nicht mehr toxisch wirkende Substanzen. Bakterizidie und Entgiftung stellen demnach die beiden Komponenten der bakteriellen Immunität dar. In der vorliegenden Arbeit versuche ich die Bedeutung der Autolyse für die Bildung bakterizider Substanzen klarzustellen.

Nachdem bereits E. Salkowski[1]) die Aufmerksamkeit auf die Existenz autolytischer Fermente gelenkt hatte, hat jüngst Martin Jacoby[2]) an der Hand im Hofmeisterschen Institut ausgeführter Versuche dargelegt, dafs die Autolyse einen während des Gesamtlebens sich vollziehenden, regressiven Prozefs von hoher, physiologischer Dignität darstellt. Ferner gelang ihm der Nachweis, dafs bei der Phosphorvergiftung eine auffällige Steigerung des autolytischen Spaltungsvorganges erfolgt. Diese Befunde drängen der Erforschung der Infektionskrankheiten neue Fragen auf. Es ergiebt sich die Notwendigkeit, festzustellen, ob eine Infektion der Organe Änderungen der in ihnen ablaufenden, fermentativen Pro-

zesse zur Folge hat, und in welcher Beziehung die Autolyse zum Heilungsvorgang steht. Ist dieser Mechanismus klargelegt, so eröffnet sich ein neuer Weg, ungeachtet der entgegenstehenden Schwierigkeiten dem Ziele, einer rationellen Immunisierungsmethode, näher zu kommen. Als erste Aufgabe in dieser Richtung ergab sich die experimentelle Untersuchung der Frage, ob der autolytische Abbau der Organe mit dem Auftreten einer bakteriziden Wirkung einhergeht, und wie eine solche zu erklären ist.

Im Folgenden soll gezeigt werden, dafs in der That die Autolyse in Folge der Bildung bakterizider Stoffe eine der Schutzvorrichtungen des Organismus gegenüber den eindringenden Krankheitskeimen darstellt. Auch über die Eigenschaften der entstehenden, bakteriziden Substanzen konnte einiges ermittelt werden, allerdings zunächst nur so viel, um eine Weiterführung der Untersuchung als dringend wünschenswert erscheinen zu lassen.

1. Die Versuchsanordnung.

In einer vor kurzem erschienenen Arbeit*) habe ich ausführlich die Methodik der aseptischen und antiseptischen Autolyse der Organe auseinandergesetzt.

Bei dem ersteren Verfahren werden die betreffenden Organe unter antiseptischen Kautelen in toto dem Tierkörper entnommen, ein bis zwei Minuten lang im kochenden Wasser gehalten, sogleich in sterilem, kaltem Wasser abgespült und danach in einer sterilen Doppelschale in den Brutschrank bei 37° verbracht. Der nach bestimmten Zeiträumen ausgeströmte Saft kam nach vorausgegangener, sorgfältiger Prüfung seiner Keimfreiheit ohne weiteres für die Bakterizidieversuche in Verwendung. Nur bei saurer oder neutraler Reaktion wurde durch entsprechenden Zusatz von steriler Natriumkarbonatlösung vorher eine schwach alkalische Reaktion hergestellt.

Bei aseptischer Autolyse der Organe von Schlachttieren**) wurde das betreffende Organ zuerst an Ort und Stelle in toto in 1 promill. Sublimatlösung eingebracht, dann erst im Laboratorium aus dieser entfernt, für ein bis zwei Minuten in kochendes Wasser gelegt, dem vor dem Erhitzen Schwefelammonium oder Schwefelnatrium zugefügt worden war, hierauf kam es in kaltes, steriles Wasser u. s. w. wie oben.

Für die antiseptische Autolyse bewährte sich folgendes Verfahren: 500 g des frischen Organs werden fein zerhackt, in 1000 ccm 0,6 proz. Kochsalzlösung eingetragen und mit einer etwa 5 cm hohen Toluol-

*) Diese Beiträge 1, S. 136 bis 182.

**) Die Keimfreiheit der lebenden tierischen Organe darf wohl auf Grund der neueren Untersuchungen als Regel angesehen werden. Bezüglich der einschlägigen Litteratur vergl. die Arbeiten von Presuhn[3]) und Chillés[4]).

schicht bedeckt. Die gut durchgeschüttelte Flüssigkeit wird einige Wochen bei 37° gehalten, während dieser Zeit das Toluol*) öfters erneuert. Hiernach filtriert man ab. Das Filtrat wird weiterhin im Vakuum zur Entfernung des Toluols in der Regel auf die Hälfte seines Volumens eingeengt und durch Zusatz von destilliertem Wasser auf sein früheres Volumen zurückgebracht. Gleichzeitig wird eventuell durch Hinzufügen von Natriumkarbonat eine schwach alkalische Reaktion hergestellt. Die toluolfreie Flüssigkeit schickt man hierauf durch die Chamberlandkerze. Nach vorangegangener Prüfung seiner Keimfreiheit wird das sterile Filtrat mittels steriler Mefspipetten in abgestuften Mengen in je 5 ccm Bouillon eingebracht; dann impft man mittels der gleichen Öse aus frisch bereiteten, gut verteilten Bouillonaufschwemmungen 24stündiger Agarkulturen, die bei 37° kultiviert waren, die gleiche Bakterienmenge in die einzelnen Proben und stellt die Zahl der übertragenen Bakterienindividuen durch Kontroll-Agarplatten mit entsprechenden Verdünnungen fest. Die durchgeschüttelten Proben werden danach in den auf 37° eingestellten Brutschrank gebracht und von Zeit zu Zeit auf Bakterienentwickelung geprüft. Bleibt das Substrat trotz wiederholten Aufschüttelns der Röhrchen klar, so liegt entweder Wachstumshemmung oder völlige Abtötung der Bakterien vor. Letztere wird dann in der Weise sichergestellt, dafs der Gesamtinhalt eines Röhrchens in 200 ccm Löfflersche Bouillon übertragen und diese weiter bei 37° gehalten wurde. Tritt dauernd keine Trübung auf, so darf die Abtötung der überimpften Bakterien als erwiesen angesehen werden.

Es wird bereitwillig zugestanden, dafs das beschriebene Verfahren die feineren Wachstumsunterschiede in den Kulturen unberücksichtigt läfst. Aber einmal galt es hier, bei der Fülle des Materials sich nur auf das Studium deutlicher und ohne weiteres sinnfälliger Entwickelungsstörungen zu beschränken. Sodann haben die Untersuchungen von Baumgarten[5]) und seiner Schüler Jetter[6]) und Walz[7]) sowie insbesondere die exakten Versuche von Alfred Fischer[8]) bei den gemeinhin gebräuchlichen Methoden der Bakterizidieprüfung, wie sie besonders in den Laboratorien von Flügge und Buchner ausgearbeitet wurden, immerhin einige, schwer vermeidbare Fehlerquellen aufgedeckt, so dafs ich die Prüfung auf Bakterizidie mit Umgehung des Plattenverfahrens und unter Zugrundelegung einer möglichst einwandsfreien Versuchstechnik durchzuführen vorzog.

In einer Reihe von Versuchen, die auf Vollständigkeit keinerlei Anspruch erheben, bin ich auch der Frage näher getreten, ob schon die frischen Organe bakterizide Eigenschaften besitzen. Indem ich die so erhaltenen Resultate mit den am autolysierten Organ geförderten Ergebnissen verglich, konnte ich leichter zu einer ob-

*) In einzelnen Versuchen bediente ich mich eines Chloroformzusatzes.

jektiven Würdigung der Autolyse und ihrer bakteriziden Leistungen gelangen.

Zur Frage nach der Bakterizidie der frischen Organe haben bereits Bitter [9]) und insbesondere Brieger, Kitasato und Wassermann [10]) wertvolle Beiträge geliefert. In der letztgenannten Arbeit wurde zuerst in planmäfsiger Weise versucht, die Eigenschaften der bakteriziden Substanzen der frischen Organe nicht nur im Reagenzglas, sondern auch mit Hülfe des Tierversuches zu ermitteln. Ferner haben auch Hankin [11]), de Christmas [12]), Kondratjeff [13]), Livingood [14]) und Wauters [15]) sich bemüht, eine bakterizide Wirkung der frischen Organauszüge experimentell sicherzustellen. Aus diesen Arbeiten geht hervor, dafs insbesondere die blutbildenden Organe im frischen Zustande über geringe bakterizide Eigenschaften verfügen.

Bei meinen Versuchen an frischen Organen bediente ich mich mit Vorteil der Buchnerschen hydraulischen Presse, welche eine sehr ergiebige Extraktion der Organelemente ermöglicht. Der Prefssaft des frischen Organs, der in der Regel eine schwach saure oder schwach alkalische Reaktion besafs, wurde durch die Chamberlandkerze filtriert und das Filtrat, eventuell mit entsprechendem Bouillonzusatz, als Nährsubstrat verwandt. In einigen Fällen wurde auch der Organprefssaft, zu gleichen Teilen mit Bouillon versetzt, eine Stunde lang gekocht und das durch ein steriles Papierfilter gegangene Filtrat in der üblichen Weise geimpft. Im Verlauf der folgenden Darstellung sollen auch gelegentliche Beobachtungen über Agglutination, ferner über Immunisierung durch autolytische Extrakte ihren Platz finden.

2. Die Verbreitung der bakteriziden Substanzen in den autolysierten Organen des Tierkörpers.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen tritt die bakterizide Wirksamkeit der Organe nur bei reichlicher Anwesenheit von antiseptisch wirkenden Organsubstanzen zu Tage. Wie die mitzuteilenden Versuche lehren, stellt die aseptische Autolyse die bei weitem schärfere Methode für den Nachweis bakterizider Substanzen im überlebenden Organe dar. Da ich aber erst gegen Ende der Untersuchung zu diesem Verfahren gelangte, so sind die meisten der folgenden Versuche unter Benutzung der Antisepsis angestellt. Ganz abgesehen von der hier unvermeidlichen Verdünnung der autolytischen Extrakte scheint sonach die Gegenwart

des Toluols und ebenso auch des Chloroforms den Vorgang der Autolyse und die Bildung der antiseptischen Stoffe in merklicher Weise zu beeinträchtigen.

Bei dem Zerstörungsprozefs, welchem die Bakterien im Tierkörper unterliegen, nimmt der Lymphdrüsenapparat eine wichtige Rolle in Anspruch. Insbesondere die Untersuchungen von Metschnikoff[16]) haben gelehrt, dafs den Leukozyten ein hervorragender Anteil an den bakteriziden Leistungen des Tierkörpers zufällt. Die Mesenterialdrüsen des Rindes stellen nun ein leicht zugängliches Material dar, und somit nahmen auch die folgenden Untersuchungen von diesen ihren Ausgangspunkt. Anschliefsend daran teile ich die Versuche mit anderen Organen mit. Von den zahlreichen

A. Lymphdrüsen.

Versuch 1. Lymphdrüsen vom Rind. Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 1 Monat. Reaktion des autolytischen Saftes schwach alkalisch.

Filtratmenge von autol. Lymphdrüs. vom Rind	Bouillonzusatz	Einsaatziffer (= 1 Öse)		Wachstum nach			
				20h	50h	70h	90h
ccm	ccm						
5	—	1750	Proteus-Bazillen	—	—	—	—
5	—	585	Milzbrand-B *).	—	—	—	—
5	—	715	Pyocyaneus-B.	—	—	—	—
5	—	62300	Friedländersche B.	—	—	—	—
5	—	65900	Staphylokokken	—	—	—	—
5	5	1750	Proteus-B.	+	+	+	+
5	5	585	Milzbrand-B.	—	—	—	—
5	5	715	Pyocyaneus-B.	—	(+)	+	+
5	5	62300	Friedländersche B.	—	—	—	—
5	5	65900	Staphylokokken	—	—	—	—
3,75	5	1750	Proteus-B.	+	+	+	+
3,75	5	585	Milzbrand-B.	—	—	—	—
3,75	5	715	Pyocyaneus-B.	—	+	+	+
3,75	5	62300	Friedländersche B.	—	—	—	—
3,75	5	65900	Staphylokokken	—	—	—	(+)

+ bedeutet Wachstum. (+) bedeutet geringes Wachstum.
— bedeutet kein Wachstum.

*) In den folgenden Versuchen kamen durchgehends sporenhaltige Milzbrandbazillen in Anwendung.

(etwa 130) Versuchsreihen ist dort, wo sich gleichartige Resultate ergeben, stets nur ein einzelnes Beispiel aufgenommen. Zu jedem vorgeführten Versuche stehen mir mindestens noch zwei gleichlautende Kontrollversuche zur Verfügung. Bei jeder einzelnen Versuchsreihe wurde das Organfiltrat stets in vier verschiedenen Bouillonverdünnungen auf seine bakterizide Wirkung hin untersucht, doch sind die Versuche mit höheren Verdünnungen, soweit sie nicht abweichende Ergebnisse brachten, der Kürze halber nur summarisch angeführt. (Siehe Versuch 1, S. 197.)

Der Versuch, der unter zehn verschiedenen, gleichlautenden Versuchsreihen allein angeführt sei, zeigt ohne weiteres, dafs sich unter den Produkten der Lymphdrüsenautolyse entwickelungshemmende Stoffe finden.

Versuch 2. Lymphdrüsen vom Rind. Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: $1^1/_2$ Monate. Reaktion des autolytischen Saftes schwach alkalisch.

Filtratmenge von autolysierten Lymphdrüsen vom Rind ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16 Stunden
5	82 200 Proteus-B.	—
5	99 400 Typhus-B.	—
5	78 800 Staphylokokken	—
5	1 620 Pyocyaneus-B.	—
5	57 300 Friedländersche B.	—
5	480 Milzbrand-B.	—
5	25 300 Koli-B.	—

Nach 16 Stunden wurden sämtliche Röhrchen in je 200 ccm Bouillon eingetragen und diese bei 37° in den Brutschrank eingestellt. Sämtliche Bouillonkolben blieben dauernd steril.

Eine Wiederholung des Versuches bestätigte nur dieses Resultat.

Hieraus darf gefolgert werden, dafs die Lymphdrüsen vom Rind bei der Autolyse nicht blofs entwickelungshemmende Substanzen, sondern auch solche von ansehnlicher bakterizider Kraft bilden.

Versuch 3. Prefssaft von Lymphdrüsen. Chamberlandfiltrat.

1 kg Mesenterial-Lymphdrüsen vom Rind werden im Mörser mit Quarzsand tüchtig zerrieben und durch die Buchnersche Presse aus-

gepreſst. Der neutral reagierende Preſssaft wird durch die Chamberlandkerze filtriert. Die Filtration geht nur langsam vor sich.

Filtratmenge von Lymphdrüsen-Preſssaft ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24h	48h	72h
5	56 300 Staphylokokken	—	—	—
5	350 Cholera-B.	—	—	—
5	80 Milzbrand-B.	—	—	—
5	61 200 Proteus-B.	—	—	—

Nach 72 Stunden werden sämtliche Röhrchen in je 200 ccm Löfflersche Bouillon eingetragen und in den Brutschrank bei 37° gestellt. Nur bei den Milzbrandbazillen trat nach 24 Stunden typisches Wachstum auf, während die übrigen drei Röhrchen steril blieben.

Versuch 4. Preſssaft von Lymphdrüsen. Chamberlandfiltrat.

Im Gegensatz zu Versuch 3 steht der nachstehende, der wieder mit dem Chamberlandfiltrat des Preſssaftes von Rinderlymphdrüsen angestellt wurde. Allerdings wurde der Preſssaft vor der Filtration zu gleichen Teilen mit Löfflerscher Bouillon versetzt. Der Preſssaft reagierte diesmal schwach alkalisch.

Filtratmenge des Preſssaftes (mit gleicher Bouillonmenge verdünnt) ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24h	48h	72h
5	22 300 Proteus-B.	+	+	+
5	18 750 Cholera-B.	+*)	+*)	+
5	920 Milzbrand-B.	+	+	+
5	31 200 Pyocyaneus-B.	+	+	+
5	15 300 Typhus-B.	+*)	+*)	+

Versuch 5. Preſssaft von Rinderlymphdrüsen, gekocht.

Ein ähnliches Resultat lieferte der folgende Versuch, in welchem 50 ccm Preſssaft von Rinderlymphdrüsen mit 50 ccm Bouillon versetzt und die Flüssigkeit eine halbe Stunde lang gekocht wurde. Das durch sterilen Filter gegebene Filtrat wurde in der folgenden Weise geimpft.

*) Mikroskopisch und makroskopisch Agglutination wahrnehmbar.

Gekochter Preſssaft von Rinderlymphdrüsen (mit gleicher Bouillonmenge verdünnt) ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16h	48h	72h
5	13 280 Typhus-B.	+	+	+
5	17 500 Cholera-B.	+	+	+
5	1 590 Milzbrand-B.	+	+	+
5	25 700 Staphylokokken	+	+	+

Aus dem Mitgeteilten darf geschlossen werden, daſs die autolysierten Lymphdrüsen vom Rind*) stets eine beträchtliche antiseptische Wirkung aufweisen, während der Preſssaft der frischen Lymphdrüsen wirksam sein kann, aber gelegentlich auch jede bakterizide Eigenschaft vermissen läſst.

B. Leber.

Versuch 6. Rindsleber**). Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 1 Woche. Reaktion: schwach sauer, durch Zusatz von Natriumkarbonat alkalisch gemacht.

Filtratmenge von autolysierter Rindsleber ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16h	40h	60h	80h
5	5	5 900 Cholera-B.	—	—	—	—
5	5	2 800 Koli-B.	—	+	+	+
5	5	145 Milzbrand-B.	—	—	—	—
5	5	1 300 Staphylokokken	—	—	+	+
5	5	4 200 Friedländersche B.	—	+	+	+
5	5	940 Pyocyaneus-B.	—	—	—	—
3,75	5	5 900 Cholera-B.	—	—	—	—
3,75	5	2 800 Koli-B.	—	+	+	+
3,75	5	145 Milzbrand-B.	—	—	—	—
3,75	5	1 300 Staphylokokken	—	+	+	+
3,75	5	4 200 Friedländersche B.	+	+	+	+
3,75	5	940 Pyocyaneus-B.	—	—	+	+

*) Analoge Versuche, welche mit den autolysierten Lymphdrüsen von Schwein, Hammel, Ziege und Pferd ausgeführt wurden, haben gleichfalls eine beträchtliche bakterizide Wirkung ergeben.

**) Bei Autolyse der Leber von Schwein, Hammel, Ziege, Pferd, Hund, Kaninchen und Meerschweinchen war eine ähnliche bakterizide Wirkung erkennbar.

Filtratmenge von autolysierter Rindsleber ccm	Bouillon-zusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16h	40h	60h	80h
2,5	5	5 900 Cholera-B.	—	+	+	+
2,5	5	2 800 Koli-B.	—	+	+	+
2,5	5	145 Milzbrand-B.	—	—	—	—
2,5	5	1 300 Staphylokokken	—	(+)	+	+
2,5	5	4 200 Friedländersche B.	(+)	+	+	+
2,5	5	940 Pyocyaneus-B.	—	(+)	+	+

Versuch 7. Rindsleber. Aseptische Autolyse.

Eine Rindsleber ($6^1/_2$ kg) wurde in toto im Schlachthause in 1 promill. Sublimatlösung gebracht und eine Portion derselben in der oben erwähnten Weise nach Entfernung des Sublimats und nach kurzem Aufenthalt in kochendem und kaltem, sterilem Wasser in steriler Doppelschale im Brutschrank bei 37° während acht Tage sich selbst überlassen. Nach dieser Zeit ist die Oberfläche in dicker Schicht von Tyrosin- und Leucinkrystallen bedeckt*). Durch Zusatz von Natriumkarbonatlösung wird die saure Reaktion des reichlich ausgeströmten Saftes in eine schwach alkalische verwandelt. Wegen der schwarzbraunen Farbe des autolytischen Lebersaftes ist nur mit Hülfe mikroskopischer Untersuchung (hängender Tropfen und Ausstrichpräparate) eine Beurteilung der Wachstumsverhältnisse möglich.

Menge des autolytischen Saftes von Rindsleber nach aseptischer Autolyse ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24h	48h	72h
5	85 Milzbrand-B.	—	—	—
5	86 500 Typhus-B.	—	—	—
5	49 200 Cholera-B.	—	—	—
5	35 600 Pyocyaneus-B.	—	—	(+)
5	78 200 Geflügel-Cholera-B.	—	—	—

Bei Verdünnungen mit Bouillon dasselbe Resultat, nur ist dann bei Pyocyaneusbazillen bereits nach 48 Stunden eine geringe Entwickelung erkennbar.

*) Wenn ich kleine Stückchen der autolysierten Lebersubstanz mit 1 bis 2 Proz. Osmiumsäurelösung im Dunkeln behandelte, mit destilliertem Wasser auswusch und in Alkohol übertrug, so zeigten die Leberzellen eine intensiv schwarze Färbung. Vergl. Siegert, diese Beiträge **1**, 114.

Nach Ablauf von 72 Stunden wurden die sämtlichen Röhrchen in je 150 ccm Löfflersche Bouillon eingetragen und letztere während mehrerer Wochen bei 37° im Brutschrank gehalten. Alle Bouillonkölbchen bis auf das mit Bacillus pyocyaneus beschickte blieben steril.

Es war somit mit Hülfe von aseptisch autolysierter Rindsleber, ebenso wie bei den Lymphdrüsenversuchen, eine vollständige Abtötung der eingebrachten Bakterienindividuen mit Ausnahme der Pyocyaneusbazillen erzielt worden. Dieses Resultat fällt um so mehr ins Gewicht, als die Prefssäfte der frischen Rindsleber, wenigstens unter den gewählten Versuchsbedingungen, in drei Versuchen keine bakteriziden Eigenschaften erkennen liefsen. (Versuch 8 und 9.)

Versuch 8. Rindsleberprefssaft. Chamberlandfiltrat.

Prefssaft von Rindsleber, Chamberland-Filtrat ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16h	48h	72h
5	65 Milzbrand-B.	+	+	+
5	9 700 Typhus-B.	+	+	+
5	7 200 Staphylokokken	+	+	+
5	70 100 Cholera-B.	+	+	+
5	15 210 Pyocyaneus-B.	+	+	+

Bei Verdünnungen mit Bouillon dasselbe, negative Resultat.

Versuch 9. Rindsleberprefssaft. Chamberlandfiltrat, gekocht.

1 Pfund Rindsleber wird fein zerhackt, in 500 ccm physiologische Kochsalzlösung gebracht und eine halbe Stunde lang unter beständigem Umrühren gekocht. Danach wird die abgekühlte Flüssigkeit filtriert und durch die Chamberlandkerze hindurchgetrieben.

Chamberlandfiltrat von gekochter, frischer Rindsleber ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16h	42h	72h
5	—	25 Milzbrand-B.	+	+	+
5	—	8 100 Typhus-B.	+	+	+
5	—	17 500 Staphylokokken	+	+	+
5	—	7 200 Pneumokokken	+	+	+

Bei Verdünnung mit Bouillon dasselbe Resultat.

C. Milz.

Versuch 10. Milz vom Rind. Toluolautolyse.

500 g Milz vom Rind, fünf Tage bei 37°. Der toluolfreie Extrakt wird durch die Chamberlandkerze getrieben. Das schwach alkalische Filtrat giebt folgende Resultate:

Chamberlandfiltrat von autolysierter Milz ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24h	Wachstum nach 48h
5	5	2 680 Staphylokokken	—	(+)
5	5	3 250 Pyocyaneus-B.	(+)	+
5	5	1 625 Typhus-B.	—	—
5	5	125 Mizbrand-B.	—	—
3,75	5	2 680 Staphylokokken	—	+
3,75	5	3 250 Pyocyaneus-B.	(+)	+
3,75	5	1 625 Typhus-B.	—	+*)
3,75	5	125 Milzbrand-B.	—	—
2,5	5	2 680 Staphylokokken	(+)	+
2,5	5	3 250 Pyocyaneus-B.	+	+
2,5	5	1 625 Typhus-B.	—	+*)
2,5	5	125 Milzbrand-B.	—	—

Die Entwickelungshemmung, welche hier beobachtet wurde, ist keine sehr beträchtliche. Bei länger dauernder Autolyse war die Wirkung deutlicher. Das geht mit ziemlicher Sicherheit aus dem nachstehenden Versuch hervor.

Versuch 11. Milz vom Rind. Toluolautolyse.

500 g Milz. Dauer der Autolyse: 2¾ Monate.

Die von Toluol befreite Flüssigkeit wird durch die Chamberlandkerze filtriert.

Chamberlandfiltrat von autolysierter Milz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16h	Wachstum nach 48h	Wachstum nach 72h
5	20 100 Proteus-B.	—	—	—
5	13 250 Cholera-B.	—	—	—
5	840 Milzbrand-B.	—	—	+
5	29 300 Pyocyaneus-B.	—	—	—
5	15 800 Typhus-B.	—	—	—

Bei Verdünnung mit Bouillon dasselbe Resultat.

*) In den mit Typhus beschickten Röhrchen tritt nach 48 Stunden eine intensive Schwarzfärbung des vorher hellbraunen Nährsubstrats auf, welche auf die Bildung von Schwefeleisen zurückzuführen ist. (Vergl. Petri u. Maassen 15.)

Aus diesem Versuche scheint hervorzugehen, dafs die Autolyse der Milz Substanzen von fast ebenso ansehnlicher, entwickelungshemmender Kraft entstehen läfst wie die Lymphdrüsen.

Versuch 12. Prefssaft von Rindermilz. Chamberlandfiltrat.

1 kg Milz vom Rind. Der schwach alkalische Prefssaft wird durch die Chamberlandkerze filtriert. Zum Vergleich wird die gleiche Bakterienmenge, wie im Versuch 11, zur Einsaat verwandt.

Prefssaft von Rindermilz (Chamberlandfiltrat) ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16h	48h	72h
5	20 100 Proteus-B.	—	(+)	+
5	13 250 Cholera-B.	(+)*)	(+)*)	(+)*)
5	840 Milzbrand-B.	+	+	+
5	29 300 Pyocyaneus-B.	—	—	+
5	15 800 Typhus-B.	+*)	+*)	+*)

Die entwickelungshemmende Wirkung des Prefssaftes von Rindermilz war nur in bescheidenem Mafse wenigstens in den mir vorliegenden, drei Versuchen wahrnehmbar. Als ich den Prefssaft in einem anderen Versuche zu gleichen Teilen mit Bouillon versetzte, die Flüsigkeit eine halbe Stunde lang kochte und dann impfte, war sogar nach 16 Stunden bereits ein sehr reichliches Wachstum vorhanden. Die mit Typhus- und Cholerabazillen beschickten Röhrchen wiesen nun, ebenso wie in dem eben mitgeteilten Versuche, eine sehr deutliche, makroskopisch und mikroskopisch erkennbare Agglutination, ferner eine partielle Paralysierung der sonst so beweglichen Bakterien auf, obschon eine halbstündige Erhitzung des frischen Milzsaftes bei Siedetemperatur vorausgegangen war. Dieser Befund läfst sich nur schwer mit den sonstigen Erfahrungen über die „Agglutinine“ in Einklang bringen **).

*) In den mit * bezeichneten Röhrchen war makroskopisch und mikroskopisch eine sehr deutliche Agglutination, ferner mikroskopisch Paralysierung der Bakterien zu konstatieren.

**) Es mag noch darauf hingewiesen werden, dafs nach meinen Versuchen (diese Beiträge 1, 139) Milzprefssaft vom Rind trotz verherigter, halbstündiger Erhitzung auf 100° beim Zusammenbringen mit Kaninchenblut eine sehr starke Hämolyse ausübte.

D. Knochenmark.

Versuch 13. Knochenmark vom Rind. Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 36 Tage. Reaktion: schwach alkalisch.

Chamberlandfiltrat von autolysiertem Knochenmark vom Rind ccm	Bouillon-zusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24 h	Wachstum nach 48 h
5	5	2 900 Milzbrand-B.	—	(+)
5	5	7 850 Typhus-B.	+	+
5	5	9 100 Cholera-B.	—	+
5	5	9 700 Staphylokokken	—	+
3,75	5	2 900 Milzbrand-B.	—	+
3,75	5	7 850 Typhus-B.	+	+
3,75	5	9 100 Cholera-B.	—	+
3,75	5	9 700 Staphylokokken	—	+
2,5	5	2 900 Milzbrand-B.	—	+
2,5	5	7 850 Typhus-B.	+	+
2,5	5	9 100 Cholera-B.	—	+
2,5	5	9 700 Staphylokokken	—	+
1,25	5	2 900 Milzbrand-B.	—	+
1,25	5	7 850 Typhus-B.	+	+
1,25	5	9 100 Cholera-B.	+	+
1,25	5	9 700 Staphylokokken	—	+

Bei dem Auspressen des Knochenmarks vom Rind mittels der Buchnerschen Presse erhielten wir eine so geringe Ausbeute, dafs füglich die Untersuchung desselben im frischen Zustande unterbleiben mufste. Es bleibt daher nur zu konstatieren, dafs der Gehalt des autolysierten Knochenmarks an entwickelungshemmenden Stoffen sich als wenig beträchtlich herausstellte.

E. Thymus.

Versuch 14. Thymusdrüse vom Kalb. Toluolautolyse.
Dauer der Autolyse: 7 Tage. Reaktion: alkalisch.

Chamberlandfiltrat von autolys. Thymusdrüse vom Kalb ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16h	40h	64h
5	—	76 300 Typhus-B.	—	—	—
5	—	52 600 Staphylokokken	+	+	+
5	—	7 020 Proteus-B.	+	+	+
5	—	5 300 Milzbrand-B.	(+)	(+)	(+)
5	—	85 620 Pyocyaneus-B.	+	+	+
5	—	84 800 Friedländersche B.	—	—	—
5	—	12 800 Cholera-B.	—	+	+
5	5	76 300 Typhus-B.	—	—	+
5	5	52 600 Staphylokokken	+	+	+
5	5	7 020 Proteus-B.	+	+	+
5	5	5 300 Milzbrand-B.	+	+	+
5	5	85 620 Pyocyaneus-B.	+	+	+
5	5	84 800 Friedländersche B.	—	—	—
5	5	12 800 Cholera-B.	+	+	+
1,25	5	76 300 Typhus-B.	—	—	+
1,25	5	52 600 Staphylokokken	+	+	+
1,25	5	7 020 Proteus-B.	+	+	+
1,25	5	5 300 Milzbrand-B.	+	+	+
1,25	5	85 620 Pyocyaneus-B.	+	+	+
1,25	5	84 800 Friedländersche B.	—	(+)	+
1,25	5	12 800 Cholera-B.	+	+	+

Die Versuche, mit dem Chamberlandfiltrat des Preſssaftes von Kalbsthymus sowie mit dem eine Stunde lang gekochten Preſssaft eine bakterizide Wirkung zu erzielen, schlugen gänzlich fehl.

F. Nebenniere.

Versuch 15. Nebenniere vom Rind. Toluolautolyse.
Dauer der Autolyse: 25 Tage. Reaktion: schwach alkalisch.

Chamberlandfiltrat von autolysierten Nebennieren vom Rind ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16h	40h
5	5	5 200 Typhus-B.	—	—
5	5	4 500 Staphylokokken	—	(+)
5	5	11 000 Pyocyaneus-B.	(+)	+
5	5	1 300 Milzbrand-B.	(+)	+
5	5	1 280 Cholera-B.	—	—

Chamberlandfiltrat von autolysierten Nebennieren vom Rind ccm	Bouillon-zusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16h	Wachstum nach 40h
3,75	5	5 200 Typhus-B.	(+)	(+)
3,75	5	4 500 Staphylokokken	—	+
3,75	5	11 000 Pyocyaneus-B.	+	+
3,75	5	1 300 Milzbrand-B.	+	+
3,75	5	1 280 Cholera-B.	—	—
1,25	5	5 200 Typhus-B.	+	+
1,25	5	4 500 Staphylokokken	—	(+)
1,25	5	11 000 Pyocyaneus-B.	+	+
1,25	5	1 300 Milzbrand-B.	+	+
1,25	5	1 280 Cholera-B.	(+)	(+)

G. Hoden.

Wirksamer als das autolytische Extrakt der Nebennieren zeigte sich der autolysierte Hoden vom Rind. Neben der entwickelungshemmenden Wirkung des Hodenautolysats ist auch die schnelle Verflüssigung dieses Organs bei der Selbstverdauung bemerkenswert.

Versuch 16. Hoden vom Rind. Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 8 Tage. Reaktion des Chamberlandfiltrats: alkalisch.

Chamberlandfiltrat v. autolysierten Hoden vom Rind ccm	Bouillon-zusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16h	Wachstum nach 40h	Wachstum nach 64h
5	—	76 000 Typhus-B.	—	—	—
5	—	52 600 Staphylokokken	—	—	—
5	—	7 100 Proteus-B.	+	+	+
5	—	5 300 Milzbrand-B.	—	—	—
5	—	85 600 Pyocyaneus-B.	—	+	+
5	—	84 800 Friedländersche B.	—	—	—
5	—	12 700 Cholera-B.	—	+	+
5	5	76 000 Typhus-B.	—	—	—
5	5	52 600 Staphylokokken	—	—	+
5	5	7 100 Proteus-B.	+	+	+
5	5	5 300 Milzbrand-B.	—	+	+
5	5	85 600 Pyocyaneus-B.	+	+	+
5	5	84 800 Friedländersche B.	—	—	—
5	5	12 700 Cholera-B.	—	+	+

Chamberlandfiltrat v. autolysierten Hoden vom Rind ccm	Bouillon-zusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16 h	40 h	64 h
3,75	5	76 000 Typhus-B.	—	—	—
3,75	5	52 600 Staphylokokken	—	—	+
3,75	5	7 100 Proteus-B.	+	+	+
3,75	5	5 300 Milzbrand-B.	—	+	+
3,75	5	85 600 Pyocyaneus-B.	+	+	+
3,75	5	84 800 Friedländersche B.	—	—	—
3,75	5	12 700 Cholera-B.	—	+	+
1,25	5	76 000 Typhus-B.	—	—	—
1,25	5	52 600 Staphylokokken	—	+	+
1,25	5	7 100 Proteus-B.	+	+	+
1,25	5	5 300 Milzbrand-B.	—	+	+
1,25	5	85 600 Pyocyaneus-B.	+	+	+
1,25	5	84 800 Friedländersche B.	—	—	(+)
1,25	5	12 700 Cholera-B.	+	+	+

Es wird sofort klar, dafs diese ansehnliche, bakterizide Wirkung auf die vorausgegangene Autolyse zu beziehen ist, wenn man zum Vergleich einen Versuch mit dem Prefssaft von frischem Hoden heranzieht.

Versuch 17. Hoden vom Rind. Prefssaft. Chamberlandfiltrat.

500 g Hoden desselben Tieres wie in Versuch 16. Der schwach sauer reagierende Prefssaft wird durch die Chamberlandkerze filtriert.

Chamberlandfiltrat des Prefssafts vom Hoden des Rindes ccm	Bouillon-zusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16 Stunden
5	1	260 Milzbrand-B.	+
5	1	32 700 Friedländersche B.	+
5	1	8 400 Typhus-B.	+
5	1	13 500 Proteus-B.	+
5	1	9 050 Cholera-B.	+

Bei stärkeren Verdünnungen mit Bouillon dasselbe negative Resultat.

H. Muskel.

Die Bedeutung, welche der Vorgang der Autolyse für die Bildung der bakteriziden Substanzen gewinnt, geht aus den folgenden Versuchen besonders klar hervor. Gerade der Muskel bietet im frischen Zustande nach vorausgegangenem Kochen (und dabei erfolgender Zerstörung der autolytischen Fermente) den ausgezeichnetsten und beliebtesten Nährboden für die Bakterien dar. Um so auffälliger ist der folgende Befund, der von im ganzen sechs gleichlautenden Versuchen hier mitgeteilt sei. Es erhellt ohne weiteres, daſs der autolysierte Rindermuskel über eine ansehnliche bakterizide Kraft verfügt.

Versuch 18. Muskel vom Rind. Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 12 Tage. Reaktion des Chamberlandfiltrats: alkalisch.

Chamberlandfiltrat von autolysiertem Rindermuskel ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16h	Wachstum nach 40h
5	—	1 600 Pyocyaneus-B.	—	—
5	—	280 Milzbrand-B.	—	—
5	—	45 200 Staphylokokken	—	—
5	—	850 Proteus-B.	—	—
5	—	13 600 Typhus-B.	—	—
5	5	1 600 Pyocyaneus-B.	—	—
5	5	280 Milzbrand-B.	—	—
5	5	45 200 Staphylokokken	—	—
5	5	850 Proteus-B.	—	—
5	5	13 600 Typhus-B.	—	—
3,75	5	1 600 Pyocyaneus-B.	—	(+)
3,75	5	280 Milzbrand-B.	—	—
3,75	5	45 200 Staphylokokken	—	—
3,75	5	850 Proteus-B.	—	—
3,75	5	13 600 Typhus-B.	—	—
1,25	5	1 600 Pyocyaneus-B.	—	(+)
1,25	5	280 Milzbrand-B.	—	—
1,25	5	45 200 Staphylokokken	—	—
1,25	5	850 Proteus-B.	—	—
1,25	5	13 600 Typhus-B.	+	+

Nach 40 Stunden werden die fünf ersten Röhrchen der Versuchsreihe in je 300 ccm Bouillon eingetragen und bei 37° längere Zeit hindurch gehalten, ohne daſs eine Entwickelung in einer der Proben aufgetreten wäre. Als ich in mehreren Versuchen Rindsmuskel im frischen

Zustande mittels der Buchnerschen Presse auspreſste und den Preſssaft als Kulturflüssigkeit verwandte, stellte sich in sämtlichen Proben die erwartete, üppige Entwickelung ein. Wir unterlassen es, diese ganz selbstverständlichen Resultate in extenso anzuführen*).

J. Darmwand.

Versuch 19. Duodenum vom Schwein. Toluolautolyse.

Die sorgfältig freipräparierte Schleimhaut des Duodenums vom Schwein wird mit dem doppelten Volumen physiologischer Kochsalzlösung und eines Zusatzes von Zinkkarbonat 14 Tage lang unter Toluol autolysiert. Reaktion des Chamberlandfiltrats: schwach alkalisch.

Chamberlandfiltrat vom autolysierten Duodenum des Schweines ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24h	Wachstum nach 48h
5	—	56 300 Staphylokokken	—	—
5	—	1 350 Cholera-B.	—	—
5	—	85 Milzbrand-B.	—	—
5	—	61 200 Proteus-B.	+	+
5	5	56 300 Staphylokokken	—	(+)
5	5	1 350 Cholera-B.	—	—
5	5	85 Milzbrand-B.	—	—
5	5	61 200 Proteus-B.	+	+

Versuch 20. Dünndarm vom Schwein (Jejunum und Ileum). Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 46 Tage. Reaktion: durch Zusatz von Natriumkarbonat vor der Einsaat schwach alkalische Reaktion hergestellt.

Chamberlandfiltrat von autolysiertem Dünndarm vom Schwein ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24h	Wachstum nach 48h	Wachstum nach 72h
5	180 Milzbrand-B.	+	+	+
5	86 500 Typhus-B.	+	+	+
5	49 200 Cholera-B.	+	+	+
5	35 600 Pyocyaneus-B.	+	+	+
5	78 200 Geflügel-Cholera-B.	—	—	—

Bei Verdünnungen mit Bouillon in sämtlichen Proben Entwickelung.

*) Analoge Versuche, welche mit dem autolysierten Muskel sowie dem Preſssaft des frischen Muskels von Pferd, Hammel und Schwein angestellt wurden, haben gleichlautende Resultate wie beim Rindermuskel ergeben.

Aus diesem Versuche läfst sich nur eine geringe entwickelungshemmende Wirkung gegenüber dem Geflügelcholerabazillus ableiten.

Weiterhin war zu prüfen, ob bei aseptischer Autolyse des Darmes bakterizide Substanzen auftreten. Aus leicht begreiflichen Gründen mufste ich davon abstehen, diese Frage am erwachsenen Tier zur Entscheidung zu bringen. Ohne jede Schwierigkeit jedoch läfst sich, wie wir gleich sehen werden, diese Versuchsanordnung am fötalen Darm herstellen.

Versuch 21. Darm von Hammelföten. Aseptische Autolyse.

Zwei Hammelföten von etwa zwei bis drei Monaten werden die Därme steril herausgenommen und zwei Tage lang der aseptischen Autolyse überlassen. Die Verflüssigung der Därme, wie überhaupt der sämtlichen fötalen Organe, erfolgt aufserordentlich rasch. Die saure Reaktion des ausgeströmten Saftes wird durch entsprechenden Zusatz von Natriumkarbonat in eine alkalische umgewandelt.

Aseptisch autolysierter Darmsaft von Hammelföten ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24h	Wachstum nach 48h
3	1 380 Cholera-B.	+	+
3	150 Milzbrand-B.	+	+
3	58 900 Proteus-B.	+	+
3	48 700 Staphylokokken	+	+
3	16 860 Typhus-B.	+	+

Bei Verdünnungen mit Bouillon dasselbe negative Resultat.

Aus diesem Versuche, der bei seiner Wiederholung mit dem aseptisch autolysierten Darm zweier Rinderföten von etwa zwei Monaten das gleiche Ergebnis lieferte, ersieht man, dafs der fötale Darm über keinerlei entwickelungshemmende Substanzen verfügt. Ich habe die Frage, ob überhaupt die fötalen Organe bakterizide Stoffe bilden, nicht näher verfolgt, möchte jedoch darauf hinweisen, dafs eine dahin gerichtete systematische Untersuchung vielleicht auch für die Lehre von der natürlichen Immunität experimentelle Stützen liefern kann.

K. Lunge.

Versuch 22. Lunge vom Schwein. Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 13 Tage. Durch Zusatz weniger Tropfen Natriumkarbonat wird die ganz schwach saure Reaktion des Chamberlandfiltrats leicht alkalisch gemacht.

Chamberlandfiltrat von autolysierter Lunge vom Schwein ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16h	Wachstum nach 40h
5	—	1 620 Pyocyaneus-B.	+	+
5	—	240 Milzbrand-B.	+	+
5	—	56 200 Staphylokokken	+	+
5	—	780 Proteus-B.	—	(+)
5	—	13 200 Typhus-B.	—	(+)
5	5	1 620 Pyocyaneus-B.	+	+
5	5	240 Milzbrand-B.	+	+
5	5	56 200 Staphylokokken	+	+
5	5	780 Proteus-B.	—	(+)
5	5	13 200 Typhus-B.	—	(+)
3,75	5	1 620 Pyocyaneus-B.	+	+
3,75	5	240 Milzbrand-B.	+	+
3,75	5	56 200 Staphylokokken	+	+
3,75	5	780 Proteus-B.	—	(+)
3,75	5	13 200 Typhus-B.	(+)	(+)
1,25	5	1 620 Pyocyaneus-B.	+	+
1,25	5	240 Milzbrand-B.	+	+
1,25	5	56 200 Staphylokokken	+	+
1,25	5	780 Proteus-B.	—	+
1,25	5	13 200 Typhus-B.	(+)	(+)

Bei aseptischer Autolyse der Lunge von Hund oder Kaninchen entstehen bereits nach 24 Stunden an der Oberfläche des Organs infolge des Zerfalls von Lungengewebe scharf begrenzte Höhlen, welche mit der Autolyse fortschreitend an Umfang zunehmen. Im Inneren dieser Kavernen sind jedesmal Leucin- und Tyrosinkrystalle in reichlicher Menge neben Fettsäurenadeln und wohl erhaltenen, elastischen Fasern vorhanden. Dieser Einschmelzungsprozess vollzieht sich bei völliger Abwesenheit von Bakterien. Impft man Bac. proteus, Staphylokokken, Streptokokken oder Micrococcus tetragenus in die Kavernen hinein und bringt das in Autolyse begriffene Organ wieder in den Brutschrank bei 37°

zurück, so geht die Vergrößerung der nunmehr übelriechenden Kavernen in beschleunigter Weise vor sich. Es liegt nahe, diese Befunde für die Frage nach der Entstehung der Kavernen bei der Lungentuberkulose zu verwerten.

L. Tonsillen.

Versuch 23. Tonsillen vom Rind. Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 42 Tage. Reaktion: durch Zusatz von wenigen Tropfen Natriumkarbonat schwach alkalisch.

Chamberlandfiltrat von autolysierten Tonsillen des Rindes ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 16 h	Wachstum nach 48 h
5	—	2020 Proteus-B.	—	+
5	—	7300 Typhus-B.	—	+
5	—	4200 Staphylokokken	(+)	+
5	—	1850 Diphtherie-B.	—	+
5	—	6280 Streptokokken	+	+
5	5	2020 Proteus-B.	—	+
5	5	7300 Typhus-B.	(+)	+
5	5	4200 Staphylokokken	+	+
5	5	1850 Diphtherie-B.	(+)	+
5	5	6280 Streptokokken	+	+

Bei höheren Verdünnungen mit Bouillon ist in sämtlichen Proben Entwickelung bereits nach 16 Stunden zu beobachten.

M. Ovarien.

Kaum beträchtlicher als bei Lungen und Tonsillen stellte sich das entwickelungshemmende Vermögen der Ovarien heraus. Immerhin ist hier in dem unverdünnten Filtrat selbst nach 48 Stunden für gewisse Bakterienarten eine vollkommene Aufhebung der Bakterienentwickelung wahrnehmbar.

Versuch 24. Ovarien einer Kuh. Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 39 Tage. Reaktion: alkalisch.

Chamberlandfiltrat von autolysiertem Ovarium einer Kuh ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 20h	48h	70h
5	—	1750 Proteus-B.	+	+	+
5	—	580 Milzbrand-B.	—	—	+
5	—	6230 Friedländersche B.	(+)	+	+
5	—	7900 Staphylokokken	—	—	+
5	—	715 Pyocyaneus-B.	—	—	+
5	5	1750 Proteus-B.	+	+	+
5	5	580 Milzbrand-B.	(+)	(+)	+
5	5	6230 Friedländersche B.	(+)	+	+
5	5	7900 Staphylokokken	(+)	+	+
5	5	715 Pyocyaneus-B.	(+)	+	+
3,75	5	1750 Proteus-B.	+	+	+
3,75	5	580 Milzbrand-B.	(+)	(+)	+
3,75	5	6230 Friedländersche B.	+	+	+
3,75	5	7900 Staphylokokken	(+)	+	+
3,75	5	715 Pyocyaneus-B.	+	+	+

Bei höheren Verdünnungen mit Bouillon allenthalben Entwickelung.

N. Pankreas.

Versuch 25. Pankreas vom Hammel. Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 3 Tage. Reaktion: alkalisch.

Chamberlandfiltrat von autolysiertem Pankreas vom Hammel ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24h	48h	72h
5	—	1175 Koli-B.	+	+	+
5		1235 Proteus-B.	+	+	+
5	—	845 Pyocyaneus-B.	+	+	+
5	—	1360 Cholera-B.	+	+	+
5	—	1950 Typhus-B.	+	+	+
5	—	860 Prodigiosus-B.	+	+	+
5	—	975 Milzbrand-B.	+	+	+

Verdünnungen mit Bouillon ergeben in sämtlichen Proben Wachstum.

Es liefs sich nicht verkennen, dafs das Wachstum in den mit autolysiertem Pankreasextrakt versetzten Bouillonröhrchen ungleich üppiger sowie schneller vor sich ging als in den zur Kontrolle mit gleicher Menge beschickten Bouillonröhrchen. Man darf daher vermuten, dafs jenes Nährmedium in auffallender Weise wachstumsbefördernd gewirkt hat.

O. Schilddrüse.

Versuch 26. Schilddrüse vom Rind. Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 14 Tage. Reaktion: alkalisch.

Chamberlandfiltrat von autolysierter Schilddrüse vom Rind ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24h	48h	70h
5	—	9380 Typhus-B.	+	+	+
5	—	2220 Staphylokokken	+	+	+
5	—	12800 Friedländersche B.	+	+	+
5	—	13400 Koli-B.	+	+	+
5	—	16960 Pyocyaneus-B.	+	+	+
5	—	5200 Cholera-B.	+	+	+

Bei Verdünnung mit Bouillon allenthalben Wachstum.

P. Submaxillarisdrüse.

Versuch 27. Submaxillarisdrüse vom Rind. Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 10 Tage. Reaktion: schwach alkalisch.

Chamberlandfiltrat von autolysierter Submaxillarisdrüse v. Rind ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24h	48h	72h
5	—	9400 Typhus-B.	+	+	+
5	—	6350 Friedländersche B.	+	+	+
5	—	810 Milzbrand-B.	+	+	+
5	—	3500 Pyocyaneus-B.	+	+	+
5	—	5260 Proteus-B.	+	+	+

Bei Verdünnung mit Bouillon gleichfalls allenthalben Wachstum.

Q. Hirn.

Versuch 28. Hirn vom Rind. Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 14 Tage. Reaktion: alkalisch.

Chamberlandfiltrat von autolysiertem Hirn vom Rind ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24h	48h	70h
5	—	980 Typhus-B.	+	+	+
5	—	1460 Pyocyaneus-B.	+	+	+
5	—	650 Milzbrand-B.	+	+	+
5	—	2300 Staphylokokken	+	+	+
5	—	9300 Proteus-B.	+	+	+

Bei Verdünnung mit Bouillon ebenfalls überall Wachstum.

R. Niere.

Versuch 29. Niere vom Rind. Toluolautolyse.

Dauer der Autolyse: 15 Tage. Reaktion: schwach alkalisch.

Chamberlandfiltrat von autolysierter Niere vom Rind ccm	Bouillonzusatz ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24h	48h	72h
5	—	1080 Pyocyaneus-B.	+	+	+
5	—	102 Milzbrand-B.	+	+	+
5	—	14600 Staphylokokken	—	(+)	+
5	—	11500 Typhus-B.	—	(+)	+
5	5	1080 Pyocyaneus-B.	+	+	+
5	5	102 Milzbrand-B.	+	+	+
5	5	14600 Staphylokokken	+	+	+
5	5	11500 Typhus-B.	+	+	+

Bei weiterer Verdünnung mit Bouillon in sämtlichen Proben Wachstum.

Anhang.

S. Preßhefe.

Aus dem Bisherigen ist ersichtlich, daß die Organzellen mancher tierischer Organe bei der Selbstverdauung Stoffe entstehen

lassen, welche die Entwickelung von Mikroorganismen hintanhalten. Es war zu untersuchen, ob nicht auch die pflanzlichen Zellen ähnliche Substanzen produzieren. Von vornherein war diese Annahme sehr wahrscheinlich, da die chemischen Prozesse in den Zellen der Pflanzen- und Tierwelt in qualitativer Beziehung keine durchgreifenden Unterschiede darbieten*). Die aseptische Zersetzung der Embryonen der Säugetiere und Menschen bei intrauterinem Tode der Frucht, die Zersetzung des nur kurze Zeit hindurch bebrüteten Embryos eines Hühnereies stellen ebenso autolytische Prozesse dar wie die Selbstzersetzung („Autophagie") der Hefezellen**). Daher habe ich zur Entscheidung der aufgeworfenen Frage Hefezellen der Autolyse überlassen. Zu diesen Versuchen verwandte ich Preßhefe, die nach Zusatz von gleichen Teilen Wasser unter Chloroform bei 40° im Brutschrank autolysiert wurde.

Versuch 30. Preßhefe. Chloroformautolyse.

Preßhefe, mit gleichen Teilen physiologischer Kochsalzlösung versetzt, drei Tage bei 40° unter Chloroform autolysiert. 25 ccm des alkalisch reagierenden, dunkelbraunen, autolytischen Saftes mit 25 ccm Löfflerscher Bouillon versetzt und durch die Chamberlandkerze filtriert. Reaktion des Chamberlandfiltrats: alkalisch.

Chamberlandfiltrat des mit Bouillon verdünnten Autolysats des Duodenums vom Schwein ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24 h	Wachstum nach 48 h
5	120 000 Staphylokokken	—	+
5	450 Milzbrand-B.	—	(+)
5	43 500 Cholera-B.	—	—
5	118 000 Typhus-B.	—	—
5	45 000 Pyocyaneus-B.	—	(+)
5	58 600 Prodigiosus-B.	(+)	+

*) Auch die Bakterienzellen bilden keine Ausnahme. Es besteht hohe Wahrscheinlichkeit, daß die in den Bakterienkulturen entstehenden bakteriziden Stoffe aus den durch Autolyse zerfallenden Bakterienleibern hervorgehen. Nach meiner Auffassung ist die von Emmerich und Löw[18]) entdeckte Pyocyanase das bakterizid wirkende, autolytische Zerfallsprodukt der Pyocyaneusbazillen. Ebenso findet die bekannte Thatsache, daß bei Wiederimpfung älterer, „erschöpfter" Bakterienkulturen kein Wachstum mehr eintritt, durch die Annahme der Gegenwart autolytischer, bakterizider Stoffe eine ungezwungene Erklärung.

**) Bezüglich der Litteratur über die Selbstverdauung der Hefezellen verweise ich auf meine frühere Arbeit (diese Beiträge 1, 147).

Nach 48 Stunden wurden die Typhusbazillen und Cholerabazillen enthaltenden Röhrchen in je 200 ccm Bouillon eingetragen und in den Brutschrank bei 37° gestellt. Selbst nach mehreren Wochen stellte sich kein Wachstum ein.

Aus diesem Versuche, der durch drei weitere, völlig gleichlautende Beobachtungsreihen noch gestützt wurde, ist zu entnehmen, dafs auch die Hefezellen bei der Selbstverdauung bakterizid wirkende Substanzen, genau so wie die tierischen Zellen, entstehen lassen. In frischer Hefe sind diese Stoffe nicht nachweisbar, wie aus dem folgenden Versuch hervorgeht.

Versuch 31. Prefssaft von frischer Hefe. Chamberlandfiltrat.

Reaktion des Filtrats: ganz schwach alkalisch.

Chamberlandfiltrat des Prefssaftes von Hefe ccm	Einsaatziffer (= 1 Öse)	Wachstum nach 24h	Wachstum nach 48h
5	21 000 Proteus-B. *)	+	+
5	15 800 Cholera-B. *)	+	+
5	680 Milzbrand-B.	+	+
5	21 200 Typhus-B. *)	+	+
5	35 600 Pyocyaneus-B. *)	+	+

3. Über die Natur der bei der Autolyse entstehenden bakteriziden Substanzen.

Von vornherein sei darauf hingewiesen, dafs es noch keineswegs feststeht, ob die bakteriziden Stoffe, welche bei der Autolyse gebildet werden, eine einheitliche Substanz darstellen, oder ob vielmehr jedes Organ seine spezifische bakterizide Substanz oder gar eine ganze Reihe ähnlich wirkender Körper hervorgehen läfst. Meine Versuche weisen eher darauf hin, dafs das Auftreten der fraglichen Substanz in den einzelnen Organen nur in quantitativer Hinsicht Verschiedenheiten aufweist, zumal in sämtlichen Fällen die untersuchten Organe bakterizide Stoffe enthielten, welche stets die gleich zu schildernden Eigenschaften besafsen. Doch

*) Mikroskopisch und makroskopisch Agglutination wahrnehmbar.

wird sich die vermutete Einheitlichkeit der Substanz erst sicher nachweisen lassen, wenn ihre Reindarstellung mit Erfolg ausgeführt ist.

1. Hitzebeständigkeit. Gleich die ersten Versuche, welche mit dem autolytischen Extrakt der Leber ausgeführt wurden, führten zu dem merkwürdigen Ergebnis, dafs die bakterizid wirkende Substanz durch vier- bis fünfstündiges Kochen nicht zerstört wird. Im Gegenteil, durchgehends konnte ich feststellen, dafs die vorangegangene Erhitzung bei Siedetemperatur die bakterizide Wirkung eher noch verstärkte. Schon das Resultat dieser Versuche machte die Annahme, als ob für das Zustandekommen der keimtötenden Wirkung fermentartige Gewebsbestandteile nach Art der wenig thermostabilen Alexine in Betracht kämen, von vornherein höchst unwahrscheinlich. Die Thatsache, dafs die Kochhitze die bakteriziden Stoffe nicht zerstört, wurde im weiteren Verlaufe der Untersuchung bei sämtlichen bakteriziden, autolytischen Organextrakten festgestellt. Die Reaktion der Flüssigkeit zeigte sich für diese Versuche ohne Belang.

2. Filtrierbarkeit durch Thonkerzen. Die bakteriziden Substanzen der sämtlichen untersuchten Organe gingen bei zwei bis drei Atmosphärendruck durch die Chamberlandkerze hindurch, ohne eine nachweisbare Einbufse in ihrer Wirksamkeit erlitten zu haben. Dieses Verhalten zeigte sich so konstant, dafs bei Herstellung der bakteriziden, autolytischen Flüssigkeiten die Filtration durch die Chamberlandkerze in jedem Versuche vorgenommen wurde. Auch bei Filtration durch die Kitasatokerzen, die Berkefeldschen Kieselgurfilter sowie das Pukallsche Filter blieb das Filtrat wirksam.

3. Adsorption durch pulverförmige Substanzen. Wenn die bakteriziden, autolytischen Extrakte mit Tierkohle, Lykopodiumsamen oder Stärkekörnern in der Schüttelmaschine längere Zeit hindurch geschüttelt wurden, behielt das Filtrat seine bakterizide Wirkung bei. Dies Verhalten entspricht auch der Thatsache, dafs bei aseptischer Autolyse der Organe die bakteriziden Stoffe in den aussickernden Gewebssaft übergingen.

4. Diffusibilität durch Membranen. Um das Verhalten der bakteriziden Stoffe bei Dialyse durch Pergamentpapier sowie durch Schilfschläuche zu prüfen, wurden folgende Versuche unternommen.

Von einer zwei Monate lang bei 37° antiseptisch autolysierten Milz vom Rinde wurden 250 ccm autolytisches Extrakt sechs Tage hindurch gegen destilliertes Wasser, das mit Toluol versetzt war, bei Zimmertemperatur in einem hohen Cylindergefäfse dialysiert. Die Aufsenflüssigkeit wurde öfters erneuert, und ihre Gesamtmenge schliefslich bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde dann in 75 ccm Bouillon + 75 ccm destilliertes Wasser aufgenommen, durch Zusatz von Natriumkarbonat schwach alkalisch gemacht und zuguterletzt durch die Chamberlandkerze filtriert. In je 5 ccm des Filtrats wurden folgende Bakterienmengen eingeimpft: 21 000 Proteusbazillen, 15 600 Cholerabazillen, 745 Milzbrandbazillen, 18 200 Pyocyaneusbazillen, 12 700 Typhusbazillen. Nach 48 Stunden noch blieb in sämtlichen Röhrchen jedes Wachstum aus.

Hiernach kann die Diffusibilität der bakteriziden Stoffe der autolysierten Milz durch Pergamentpapier nicht mehr zweifelhaft sein. Auch die Versuche, welche die Prüfung der Durchgängigkeit der bakteriziden Stoffe durch die Schilfmembranen bezweckten, führten zu dem gleichen Ergebnis.

So wurde der autolytische Saft der Hefezellen gleichzeitig in mehrere, vorher sterilisierte Schilfschläuche eingefüllt und vier Tage lang gegen destilliertes Wasser im Brutschrank bei 37° dialysiert. Täglich wurde die Aufsenflüssigkeit erneuert, und ihre Gesamtmenge schliefslich bis auf das halbe Volumen des ursprünglichen Dialysats eingedampft. Je 2 ccm Rückstand wurden mit je 2 ccm Löfflerscher Bouillon versetzt und in jedes Röhrchen 15 200 Typhusbazillen, 23 400 Pyocyaneusbazillen, 580 Milzbrandbazillen und 1350 Proteusbazillen eingesät. Selbst nach 48 Stunden blieb jedes Wachstum aus.

Die gleichen Resultate erhielt ich, als ich unter sonst gleichen Versuchsbedingungen die autolytischen Extrakte von Leber, Lymphdrüsen, Muskel und Milz vom Rinde verwandte. Nach alledem mufs die Diffusibilität der bakteriziden Stoffe, welche durch Autolyse entstehen, als erwiesen angesehen werden.

5. Löslichkeit in Alkohol. Zur Ermittelung des Verhaltens der bakteriziden Stoffe gegenüber Alkohol wurden die folgenden Versuche angestellt:

Lymphdrüsen vom Rinde wurden in der üblichen Weise einen Monat lang autolysiert. Von dem autolytischen, durch die Chamberlandkerze filtrierten Extrakt wurden 1300 ccm auf 100 ccm im Vakuum bei 35° eingedampft. Von dem Vakuumrückstande wurden 20 ccm mit 200 ccm absolutem Alkohol versetzt. Der entstehende Niederschlag (I.) und das Filtrat (II.) wurden getrennt weiter verarbeitet.

I. Der Niederschlag wird in möglichst wenig Wasser gelöst, mit absolutem Alkohol von neuem versetzt, dann der Niederschlag aus-

gewaschen, und diese Prozedur fünfmal wiederholt. Nachdem hierauf der Niederschlag zur Trockne gebracht war, wurde er in 4 ccm destilliertes Wasser aufgenommen und letzteres in 76 ccm Löfflersche Bouillon + 70 ccm destilliertes Wasser eingetragen. Je 5 ccm dieser vorher noch sterilisierten Flüssigkeit wurden sodann mit je einer Öse Typhusbazillen (110 000 Kolonieen), Staphylokokken (2080 Kol.), Diphtheriebazillen (1560 Kol.) und Geflügelcholerabazillen (2180 Kol.) geimpft. Nach 16 Stunden war in sämtlichen Röhrchen Entwickelung eingetreten.

II. Das Alkoholfiltrat wird auf dem Wasserbade bei Siedetemperatur eingedampft und in 76 ccm Löfflersche Bouillon, 73 ccm destilliertes Wasser + 1 ccm 10 proz. Natriumkarbonatlösung eingetragen. Je 5 ccm dieser vorher noch sterilisierten Flüssigkeit wurden mit den gleichen Bakterien bei gleicher Einsaatziffer wie im vorigen Versuche beschickt. Selbst nach 70 Stunden ist in keinem Röhrchen eine Entwickelung aufgetreten.

Hieraus geht mit aller Sicherheit hervor, dafs die bakteriziden Substanzen, welche der Autolyse ihre Entstehung verdanken, alkohollösliche Körper darstellen. In weiteren Versuchen wurde festzustellen gesucht, ob die bakteriziden Stoffe aus dem Alkoholfiltrat mittels Äthers gefällt werden können.

Von dem autolytischen Extrakt von Lymphdrüsen des Rindes, der im Vakuum von 260 ccm auf 26 ccm eingedampft worden war, werden 20 ccm mit 200 ccm absolutem Alkohol versetzt. Das Filtrat wird sodann mit 200 ccm Äther gefällt und sowohl Niederschlag wie Filtrat getrennt weiter verarbeitet. Der Ätherniederschlag wird in wenig heifsem Wasser vollständig gelöst und in 50 ccm Löfflersche Bouillon + 45 ccm destilliertes Wasser eingetragen. Das Filtrat wird durch Destillation und nachfolgendes Eindampfen bis zur Syrupkonsistenz gänzlich von Alkohol und Äther befreit, der Rückstand gleichfalls in 50 ccm Löfflerscher Bouillon + 45 ccm destilliertes Wasser aufgenommen. Während der Ätherniederschlag bei Einsaat der gleichen Bakterienmenge wie im vorigen Versuche deutlich bakterizide Wirkungen zeigte, war das Ätherfiltrat gänzlich unwirksam.

Wir ersehen somit aus diesem Versuche, dafs die bakteriziden Stoffe aus dem Alkoholfiltrat mittels Äthers so gut wie quantitativ gefällt werden.

Was die weitere chemische Charakteristik der bakteriziden Stoffe angeht, so liefs sich zur Zeit wegen Mangels an Material keine Reindarstellung durchführen. Ich habe nur versucht, durch einige Reaktionen wenigstens in groben Umrissen Näheres über die Natur der fraglichen Stoffe in Erfahrung zu bringen. Es liefs sich feststellen, dafs das wirksame Alkoholfiltrat bei längerem Stehen einen krystallinischen Niederschlag absetzte, der aus Kochsalz-,

Tripelphosphatkrystallen und leucinähnlichen Kugeln bestand. Letztere waren durchscheinend, von strahligem Bau, jedoch wasserunlöslich, also jedenfalls kein Leucin. Sie lösten sich nicht in Aceton. Bei Zusatz von Wasser schieden sich ölige Tropfen aus. Das Alkoholfiltrat gab ferner Millonsche Reaktion, ebenso fiel die Xanthoproteinreaktion positiv aus. Die wässerige Lösung klärte sich beim Erhitzen und trübte sich wiederum beim Erkalten. Mit Phosphorwolframsäure schied sich ein dicker Niederschlag aus, der sich beim Erhitzen teilweise löste, teilweise krystallinisch zu Boden fiel. Beim Erkalten fiel übrigens der in Lösung gegangene Teil wieder aus. Bei Zusatz von ammoniakalischem Silber entstand kein Niederschlag, demnach sind Purinbasen auszuschliefsen. Wurde das Alkoholfiltrat mit Jodquecksilberkalium versetzt, so trat ein geringer Niederschlag auf. Bromdämpfe gaben einen dicken, gelben, flockigen Niederschlag. Weiter konnte gezeigt werden, dafs der Ätherniederschlag die gleichen Reaktionen gab wie das Alkoholfiltrat. Es handelt sich demnach aller Wahrscheinlichkeit nach hier um denselben Körper. So wenig diese Befunde genügen, sich über die Natur der bakteriziden, autolytischen Stoffe zu orientieren, so weisen sie doch darauf hin, dafs die fraglichen Substanzen hydrolytische Spaltungsprodukte der Proteinsubstanzen darstellen und zwar, nach der Millonschen, Xanthoprotein- und Bromreaktion zu schliefsen, zu dem aromatischen Komplex des Eiweifsmoleküls in Beziehung stehen.

4. Zusammenfassende Bemerkungen.

Nachstehend gebe ich, um den Überblick zu erleichtern, eine tabellarische Zusammenstellung der angeführten Versuche, geordnet nach der Intensität der beobachteten bakteriziden Wirkung.

I. Versuche mit autolysierten Organen.

Versuchsnummer	Organ	Art der Autolyse	Hemmende Wirkung
18	Muskel	Toluol-A.	stark
1	Lymphdrüsen	„	„
2	„	„	„
7	Leber	aseptische A.	„

Versuchsnummer	Organ	Art der Autolyse	Hemmende Wirkung
6	Leber	Toluol-A.	deutlich
11	Milz	„	stark
10	„	„	deutlich
16	Hoden	„	„
14	Thymus	„	„
15	Nebennieren	„	„
19	Duodenum	„	„
13	Knochenmark	„	deutlich-gering
24	Ovarien	„	„
22	Lunge	„	gering
23	Tonsillen	„	„
29	Niere	„	„
20	Jejunum u. Ileum	„	sehr gering
21	Fötusdarm	aseptische A.	fehlt
25	Pankreas	Toluol-A.	„
26	Schilddrüse	„	„
27	Submaxillaris	„	„
28	Hirn	„	„

II. Versuche mit frischen Preſssäften.

Versuchsnummer	Organ	Hemmungswirkung
—	Muskel	fehlt
4	Lymphdrüsen	deutlich
5	„	fehlt
8	Leber	„
12	Milz	gering
17	Hoden	fehlt

Die aus diesen Tabellen ersichtlichen Verhältnisse fordern zu einer Betrachtung der bei Infektion verschiedener Organe sich ergebenden Unterschiede auf. Doch sind hier andere, vorläufig nicht zu übersehende, mitbeteiligte Momente von solchem Einfluſs, daſs an einfaches Parallelgehen von vornherein nicht gedacht werden kann. Immerhin scheint mir Folgendes einer Hervorhebung wert. Für die Beurteilung der während des Lebens an den unversehrten Organen erfolgenden Infektion können von meinen Versuchen nur die mit frischen Preſssäften ausgeführten herangezogen werden. Da ist es nun bemerkenswert, daſs gerade Lymphdrüsen und Milz eine wenn auch geringe, so doch deutlich

nachweisbare Hemmungswirkung haben erkennen lassen, entsprechend der Erfahrung, dafs den Leukozyten, beziehungsweise ihren Depots, eine wesentliche Rolle bei Verhütung der Infektion zufällt. Es liegt die Vorstellung nahe, dafs in beiden Fällen ein gemeinsames Moment Ursache der bakteriziden Wirkung ist: die in diesen Organen sich vollziehende lebhafte Zellenproliferation. Es entspricht dies der im Konkurrenzkampf zwischen verschiedenen Bakterien wahrzunehmenden Thatsache, dafs die sich lebhafter vermehrenden Organismen das Übergewicht erhalten. Im vorliegenden Falle mufs daran gedacht werden, dafs die lebhaft proliferierenden Zellen nicht etwa durch Nahrungsentziehung, sondern durch in ihnen während des Wachstums entstehende bakterizide Stoffe, beziehungsweise deren Vorstufen, den eindringenden oder bereits ansässigen Bakterien gefährlich werden.

Für die Beurteilung der nach erfolgter Infektion sich abspielenden Vorgänge kommen allerdings auch die autolytischen Prozesse in Betracht, soweit nämlich zugleich mit oder nach der Infektion ein Absterben der Gewebe erfolgt. Je nach der Fähigkeit des infizierten Organs, durch Autolyse bakterizide Stoffe zu bilden oder nicht, geht am Infektionsort die weitere Vermehrung der Bakterien rascher oder träger vor sich. Im ganzen entspricht auch hier die Beobachtung, dafs die blutbildenden Organe insgesamt, wenn auch in verschiedener Menge bakterizide Produkte liefern, dafs sich ihnen Muskel und Leber zur Seite stellen, andere Organe, z. B. Lunge, Niere, ihnen merklich nachstehen, ungefähr den pathologischen Thatsachen. Von einer Ausführung dieser Beziehungen mufs jedoch vorläufig um so mehr abgesehen werden, als die mitgeteilten Versuche bereits erkennen lassen, dafs auch die spezifische Natur der in Frage kommenden Bakterien eine mafsgebende Rolle spielt*), allgemeine Betrachtungen hier demnach unzulässig sind. Um so dringlicher erscheint es, vom pathologischen Gesichtspunkte das Verhalten von Prefssäften und autolytischen Auszügen der einzelnen Organe gegenüber jenen Bakterien plan-

*) Wie kurz erwähnt, wird die Spezifität der bakteriziden, autolytischen Substanzen der einzelnen Organe durch meine Versuche nicht mit aller Sicherheit erwiesen. Aber selbst dies zugegeben, liegt kein Grund vor, eine etwas mystische, elektive Bakterizidie, die etwa nur den Körperzellen zukäme, anzunehmen. Vielmehr geht aus den Versuchen von Boer [19]), die ich bestätigen konnte, unzweifelhaft hervor, dafs auch gewisse Farbstoffe, wie z. B. Malachitgrün oder Methylviolett, eine verschiedene antiseptische bezw. entwickelungshemmende Kraft gegenüber bestimmten Mikroorganismen entfalten.

mäfsig zu untersuchen, von denen sie am häufigsten befallen werden*).

Beachtenswert scheinen mir trotz ihrer Spärlichkeit die über die chemische Natur der bakteriziden Stoffe ermittelten Thatsachen. Danach sind die bakteriziden Stoffe keine fermentartigen Körper, wie allein schon aus ihrer Hitzebeständigkeit gefolgert werden darf. Wir sind vielmehr berechtigt, anzunehmen, dafs sie Abbauprodukte der Eiweifssubstanzen darstellen und in Beziehung zum aromatischen Komplex des Eiweifsmoleküls zu bringen sind. Durch diese Feststellung gewinnt der intermediäre Stoffwechsel auch für die Kenntnis von dem Wesen des Heilungsvorganges bei Infektionskrankheiten erhöhte Bedeutung.

Durch die mitgeteilten Versuche ist erwiesen, dafs aus gewissen, aseptisch absterbenden Organzellen bakterizide Stoffe gebildet werden. Wir wissen aber andererseits, dafs bei jeder Infektion Zellen in grofser Zahl zu Grunde gehen. Nach der von Virchow[21]) begründeten Lehre von der „parenchymatösen Entzündung" beruht das Wesen der Entzündung in einer primären Schädigung der Gewebszellen. Die nekrobiotischen Vorgänge im Zellenleben [Weigert[22])] stellen nun, wie bereits Kraus[23]) hervorgehoben hat, nichts anderes als autolytische Prozesse dar. Es besteht daher grofse Wahrscheinlichkeit, dafs durch Absterben der Zellen und gleichzeitig erfolgende Bildung der bakteriziden, autolytischen Spaltungsprodukte der Infektion ein Hindernis erwächst. Die teilweise Zerstörung der Zellen, selbst die Einschmelzung des Gewebes bei der Eiterung stellen keineswegs einen schädlichen, deletären Vorgang dar, vielmehr ist hier der Zellentod ein durchaus zweckmäfsiger Prozefs, die Autolyse eine Schutzvorrichtung des Organismus.

Es kann nach dem Bisherigen nicht zweifelhaft sein, dafs die bakteriziden Stoffe der Autolyse mit den bereits in ihrer Wirkung bekannten Schutzstoffen des Blutes, den Alexinen, nicht identifiziert werden dürfen. Immerhin ist die Möglichkeit eines Zusammenhanges gegeben. Es wäre nämlich denkbar, dafs das Alexin das im Blut vorhandene, autolytische Ferment darstellt, welches erst sekundär aus den Eiweifsstoffen des Blutes die bakterizid wirkenden Abbauprodukte herstellt. Allerdings spricht gegen diese Auffassung der Umstand, dafs es mir bisher nicht glückte, bei Autolyse

*) Vgl. Babes[20]) Bemerkungen über das Verhalten gewisser Organe gegenüber spezifischen Infektionen.

des aseptisch aufgefangenen Blutes zu beträchtlicher bakterizider Wirkung zu gelangen.

Durch die grundlegenden Versuche von Ehrlich[24]) und seiner Schule ist die Vorstellung begründet worden, dafs die Entgiftung der Bakterientoxine auf Bindung des Toxins an Bestandteile des Zellprotoplasmas beruht. Nach dieser Auffassung stellt sich der Entgiftungsvorgang als ein synthetischer dar. Die bakterizide Wirkung der autolysierten Organe beruht im Gegensatz hierzu auf destruierenden Prozessen; nicht der Aufbau, der Abbau liefert die wirksamen Substanzen.

Die enge Beziehung, welche zwischen Bakterizidie und Immunität besteht, läfst es gerechtfertigt erscheinen, wenn ich wenigstens in einigen Versuchen der Frage nachzugehen suchte, ob wirksame bakterizide, autolytische Extrakte Tiere gegen eine gleichzeitige Infektion zu schützen vermögen. Die Ergebnisse der allerdings sehr spärlichen Versuchsreihen mögen hier ihre Stelle finden.

Zwei Kaninchen von 1160 g und 1350 g erhalten am 27. 5. 1900 je 10 ccm Chamberlandfiltrat von Kalbsthymus, die sieben Tage unter antiseptischen Bedingungen autolysiert worden war, in die Ohrvene. Am folgenden Tage werden nochmals je 10 ccm desselben Filtrats in die Ohrvene injiziert. Sofort danach wird eine Milzbrandaufschwemmung, welche 55 570 vegetative Milzbrandbakterien enthielt, den Kaninchen unter die Haut gespritzt. Während die beiden Kontrolltiere von 1280 g und 1410 g, welche die gleiche Menge der Aufschwemmung subkutan erhalten hatten, nach 70 bis 90 Stunden an Milzbrand starben, blieben die vorbehandelten Kaninchen dauernd am Leben.

Ein ähnliches Resultat lieferte auch der folgende Versuch, der mit dem Chamberlandfiltrat vom Hoden des Stiers nach achttägiger antiseptischer Autolyse angestellt wurde.

Zwei Kaninchen von 2390 g und 1850 g erhielten je 30 ccm Chamberlandfiltrat von autolysierten Hoden in die Ohrvene. Unmittelbar danach wurde den Tieren eine Milzbrandaufschwemmung, welche 23 400 vegetative Milzbrandbakterien enthielt, subkutan eingespritzt. Während die beiden Kontrolltiere von 2020 g und 1780 g in der Nacht nach etwa 70 Stunden an Milzbrand eingingen, blieben die mit autolytischem Hodenextrakt behandelten Kaninchen dauernd am Leben.

Von Interesse ist schliefslich noch der folgende Versuch, der vielleicht dafür zu sprechen scheint, dafs selbst der für die Milzbrandinfektion äufserst empfängliche Meerschweinchenorganismus durch Zufuhr von autolysiertem Milzextrakt eine erhöhte Resistenz gegenüber der Milzbrandinfektion gewinnt.

Zwei Meerschweinchen von 340 und 380 g erhielten eine drei Minuten lang gut durchgeschüttelte Mischung von 10 ccm Chamberland-

filtrat von 18 Tage lang antiseptisch autolysierter Milz vom Rinde und 165 vegetativen Milzbrandbakterien*) in die Bauchhöhle. Während die beiden Kontrollmeerschweinchen von 280 g und 315 g nach 35 bis 40 Stunden der Milzbrandinfektion erlagen, blieben die beiden, gleichzeitig mit autolytischem Milzextrakt behandelten Meerschweinchen am Leben. Als jedoch dieselben nach 11 Tagen mit 1 ccm einer 250 vegetative Milzbrandbakterien enthaltenden Aufschwemmung intraperitoneal geimpft wurden, gingen sie zur selben Zeit ein wie die beiden Kontrolltiere.

Es bedarf keiner weiteren Ausführung, dafs diese spärlichen, relativ günstigen Resultate nicht allzu viel beweisen. Sie ermutigen jedoch zu weiteren Untersuchungen, die von der neugewonnenen Kenntnis der Beziehung der Autolyse zur bakteriziden Wirkung der Organe auszugehen hätten.

Ich möchte diese Untersuchung nicht schliefsen, ohne auf die bekannte Thatsache hingewiesen zu haben, dafs bei der Fäulnis**) bakterizide Substanzen auftreten. Die Autolyse verläuft im ganzen im gleichen Sinne wie die Fäulnis, gewisse autolytische Produkte wirken gleichfalls bakterizid, nur kommen sie, und das ist bedeutungsvoll, als intermediäre Stoffwechselprodukte schon während des Lebens dem Organismus zu gute.

Litteratur-Verzeichnis.

[1]) E. Salkowski: Zeitschrift für klinische Medizin. Supplement zu Band 17 (1890).

[2]) Martin Jacoby: Zeitschrift für physiol. Chemie 30 (1900).

[3]) V. Presuhn: Inaugural-Dissertation, Strafsburg 1898.

[4]) A. A. Chillès: Inaugural-Dissertation, Strafsburg 1901.

[5]) P. Baumgarten: Lehrbuch der Mykologie. Braunschweig 1890. Berliner klinische Wochenschrift (1899).

[6]) P. Jetter: Arbeiten a. d. pathol.-anat. Institut zu Tübingen 1, 421.

*) Die Bestimmung der Bakterienmenge wurde erst nach erfolgter, drei Minuten langer Einwirkung des Milzsaftes auf die Milzbrandbazillen vorgenommen.

**) Zu Beginn des vorigen Jahrhunderts hat schon der Anatom Johann Friedrich Meckel[25]) den Vorgang der Autolyse von dem der Fäulnis unterschieden. Nachdem er darüber abgehandelt, dafs der menschliche Fötus bei intrauterinem Fruchttod sich in eine „walratähnliche" Masse verwandelt, fährt er fort: „Gewöhnlich hält man ihn dann für völlig tot, allein wahrscheinlich mit Unrecht, indem er teils die angegebenen Veränderungen auf eine aktive Weise erleiden mufs, teils, wäre er wirklich tot, in Fäulnis übergehen würde. Er lebt, aber wahrscheinlich nur das niedrigste Leben, das Leben des Eies und Samenkornes, das sich nur durch Nichtverderbnis unter Umständen, welche dieselbe begünstigen, offenbart."

[7]) K. Walz: Arbeiten a. d. pathol.-anat. Institut zu Tübingen 3, 1.
[8]) A. Fischer: Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 1900, 35, Heft 1.
[9]) H. Bitter: Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 1892, 12, 328.
[10]) Brieger, Kitasato und Wassermann. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 1892, 12, 137.
[11]) E. H. Hankin: The British med. Journ. 1890, vol. 2, p. 65. Centralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenkunde 1891, 9, 336 u. 372.
[12]) M. J. de Christmas: Annal. de l'Inst. Pasteur 1891, vol. 5, p. 487.
[13]) A. J. Kondratjeff: Centralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenk. 1897, 21, 407.
[14]) L. E. Livingood: Centralbl. für Bakteriol. u. Parasitenk. 1898, 23, 980, 1002, 1043.
[15]) Wauters: Ref. Baumgartens Jahresberichte 1900, 14, 832.
[16]) E. Metschnikoff: „Immunität." Weyls Handbuch der Hygiene, 1897, 32. Lieferung.
[17]) Petri u. Maassen: Arbeiten aus dem kaiserl. Gesundheitsamte 1893, 8, 318.
[18]) R. Emmerich u. O. Loew: Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1899, 31, 1.
[19]) O. Boer: Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1890. 9, Tab. I.
[20]) V. Babes: Berliner klin. Wochenschr. 1899, S. 362.
[21]) R. Virchow: Cellularpathologie und Handbuch der spez. Pathologie 1854, 1.
[22]) K. Weigert: Virchows Arch. 79. Deutsch. med. Woch. 1885, 747, 780, 795, 813.
[23]) Fr. Kraus: Archiv für experim. Path. und Pharmak. 1887, 22, 174.
[24]) P. Ehrlich: Schlufsbetrachtungen. Nothnagels spezielle Pathologie und Therapie, 8, 1901.
[25]) J. F. Meckel: Handbuch der pathologischen Anatomie. Leipzig 1816. 2, 1, 171.

XIII.

Über tierische Tyrosinasen und ihre Beziehungen zur Pigmentbildung.

Von Priv.-Doz. Dr. **Otto v. Fürth** und **Hugo Schneider**.
Assistenten am physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

1. Pflanzliche und tierische Tyrosinase.

Durch Einschnitte in die Stammrinde verschiedener, in Südostasien einheimischer Rhus-Arten wird ein gelber Rindensaft gewonnen, der sich an der Luft aufserordentlich schnell in einen tiefschwarzen Lack verwandelt und der bekanntlich Chinesen und Japanern vielfach dazu dient, Möbel und Gebrauchsgegenstände mit einem schönen Lackfirnis zu überziehen.

Bertrand hat, anknüpfend an Beobachtungen von Yoshida, festgestellt, dafs die Umwandlung des Rindensaftes des tonkinesischen Lackbaumes in einen schwarzen Firnis durch die Wirkung eines oxydativen Fermentes, der „Laccase", auf eine alkohollösliche, aufserordentliche oxydable, jedenfalls der aromatischen Gruppe angehörende Substanz, das Laccol, zustande kommt. Durch zahlreiche, von Bertrand*), Bourquelot und anderen Forschern ausgeführte Untersuchungen hat es sich ergeben, dafs die Laccase befähigt ist, viele aromatische Substanzen, insbesondere aber solche, welche mehrere Hydroxyl- oder Amidogruppen im Kern enthalten, zu oxy-

*) Bertrand, Sur le latex de l'arbre à laque, Compt. rend. **118**, 1215—1218. — Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase, ibid. **120**, 266. — Bertrand-Bourquelot, Le bleuissement et le noircissement des champignons, Compt. rend. soc. biol. (10) **2**, 582—588. — La laccase dans les champignons, ibid. 579—582. Bertrand, Sur la recherche et la présence de la laccase dans les végétaux, Compt. rend. **121**, 166—168. — Bourquelot, Influence de la réaction du milieu sur activité du ferment oxydant des champignons, ibid. **123**, 260, wie auch ibid. 315 und 423.

dieren. Es wurde ferner festgestellt, dafs ähnlich wirkende oxydative Fermente sich im Pflanzenreiche weit verbreitet finden und vielfach die Verfärbung von Pflanzensäften an der Luft verursachen.

Nach Bertrand*) findet sich nun in gewissen Pflanzen, so bei manchen Pilzen (Russula-Arten), in Dahlien sowie in Runkelrüben neben der Laccase ein durch seine spezifische Wirkung auf Tyrosin ausgezeichnetes Ferment, eine „Tyrosinase". Danach wäre die Dunkelfärbung der Säfte genannter Pflanzen an der Luft auf eine Oxydation des Tyrosins durch dieses Enzym zu beziehen.

Neuerdings beobachtete Gonnermann**), dafs in den Rübensäften enthaltene Enzyme Tyrosin in Homogentisinsäure überführen, welche letztere durch den Sauerstoff der Luft kirschrot oder blauschwarz gefärbt wird.

Bertrand***) hat einen Weg angegeben, um die beiden in Pilzen nebeneinander vorkommenden Fermente voneinander zu trennen. Ein mit Chloroformwasser bei Zimmertemperatur bereitetes Extrakt von Russula delica wurde mit Alkohol gefällt (2 Tle. Extrakt, 3 Tle. Alkohol). Das bei einer 50° nicht überschreitenden Temperatur eingeengte Filtrat enthielt die Laccase und vermochte Hydrochinon und Pyrogallol, nicht aber Tyrosin, kräftig zu oxydieren. Der Alkoholniederschlag wurde mit Chloroformwasser extrahiert, die Lösung mit Alkohol gefällt und der Niederschlag in Wasser gelöst. Die tyrosinasehaltige Lösung war befähigt, Tyrosin unter Bildung dunkel gefärbter Produkte kräftig zu oxydieren, war jedoch ohne Wirkung auf Hydrochinon und Pyrogallol. Auch der Umstand, dafs die Tyrosinase gegen Wärme empfindlicher ist als Laccase und bereits durch kurzdauernde Einwirkung einer Temperatur von 50 bis 70° zerstört wird, gestattet eine Trennung. Harley†) bediente sich der Tyrosinase aus Russula, um die Gegenwart von Tyrosin in Verdauungsgemischen nachzuweisen.

Über das Vorkommen von Tyrosinase bei Tieren scheint bisher nur eine Beobachtung vorzuliegen. W. Biedermann

*) Bertrand, Compt. rend. 122, 1215.

**) M. Gonnermann, Homogentisinsäure, die farbbedingende Substanz dunkler Rübensäfte. Pflügers Arch. (1900) 82, 289—302.

***) Bertrand, Sur la présence simultanée de le Laccase et de la Tyrosinase dans le suc de quelques champignons, Compt. rend. 123, 460.

†) Harley, Journ. pharm. chim. (6) 9, 225, ref. in Chem. Centralbl. (1899) 1, 850, siehe auch ibid. (1900) 1, 676.

bemerkte gelegentlich von Eiweifsverdauungsversuchen mit dem Darminhalte von Mehlwürmern (Tenebrio molitor), dafs die tyrosinhaltige Verdauungsflüssigkeit eine dunkle, vom Luftzutritt abhängige Färbung annahm, und er bezog dieselbe auf die Gegenwart einer Tyrosinase: „Bringt man", sagt Biedermann*), „die Mitteldärme von drei bis vier hungernden Mehlwürmern in etwas Chloroformwasser, so erhält man eine leicht gelblich gefärbte Lösung, welche in zwei Teile geteilt wird. Die eine Hälfte bleibt unverändert, zur anderen werden einige Tropfen Tyrosinlösung gebracht. Läfst man beide Proben in offenen Uhrschälchen über Nacht in einer feuchten Kammer stehen, so findet man die tyrosinhaltige Probe violett-schwarz gefärbt, während die andere Probe nur wenig gedunkelt erscheint." Weitere Versuche ergaben, dafs die Tyrosinase sowohl gegen freie Säure, als auch gegen Alkali hochgradig empfindlich sei.

Wir haben, von Untersuchungen über das Lepidopterenblut ausgehend, wie im Nachstehenden ausgeführt werden soll, gefunden, dafs ein der Tyrosinase entsprechendes Enzym einen regelmäfsigen Bestandteil der Hämolymphe von Insekten und auch anderen Arthropoden bildet und eine längst bekannte Erscheinung, nämlich die Schwärzung derselben an der Luft, verursacht.

Die Körperflüssigkeit der Insekten ist nämlich durch die auffallende Eigenschaft ausgezeichnet, einige Zeit nach Verlassen des Körpers eine dunkle Färbung anzunehmen. Die Schnelligkeit, mit der sich diese Veränderung („Melanose") vollzieht, scheint sehr grofsen Schwankungen unterworfen zu sein. Krukenberg**) beobachtete bei verschiedenen in gleicher Weise gefütterten Exemplaren derselben Species (Hydrophilus piceus), dafs die Schwärzung der dem Körper entnommenen Hämolymphe bald innerhalb weniger Minuten, bald aber erst nach Stunden erfolgte; zuweilen war diese Veränderung noch nach zwei Tagen ausgeblieben.

Léon Frédéricq***) sprach die Meinung aus, die Verfärbung des Blutes werde durch Sauerstoffzutritt bedingt, während

*) W. Biedermann, Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Verdauung I, Die Verdauung der Larven von Tenebrio molitor. Pflügers Archiv, (1898) **72**, 105—162.

) Krukenberg, Uber Hydrophiluslymphe. Verh. des naturw.-medizinischen Vereins zu Heidelberg. Neue Folge (1881) **3, 79—88.

***) L. Frédéricq, Sur le sang des Insectes. Bull. de l'Acad. roy. de Belgique. 3. Serie (1881) **1**, 487—490.

Krukenberg dieser Angabe gegenüber betonte, die genannte Veränderung werde nicht durch Sauerstoff, sondern vielmehr durch Kohlensäure hervorgerufen. Während Sauerstoffzufuhr die Farbe des dem Körper frisch entnommenen Insektenblutes nicht beeinflusse, bewirke bereits die erste eingeleitete Kohlensäureblase sogleich das Auftreten einer tiefschwarzen Färbung, die durch nachheriges Schütteln mit Luft nicht mehr rückgängig gemacht werden könne.

L. Frédéricq*) und Krukenberg**) bemühten sich, die Bedingungen, unter denen die „Melanose" eintritt, näher zu studieren. Es wurde festgestellt, dafs die Verfärbung von der Oberfläche her beginnt, dafs sie durch Schlagen, durch Eintragen poröser Substanzen, durch Luftzutritt sowie durch Wasserzusatz gefördert, durch Sättigung des Blutes mit Neutralsalzen sowie durch Säuren und Alkalien gehindert werde. Über den Einfluſs von Alkohol sind die Autoren nicht einig.

Léon Frédéricq machte ferner die bemerkenswerte Beobachtung, dafs die Verfärbung des entleerten Blutes ausbleibt, wenn das betreffende Insekt vor der Blutentnahme eine Viertelstunde lang auf 50 bis 55° erwärmt worden war (Erwärmen auf 45° soll keinen Effekt haben). Unter diesen Verhältnissen komme es nicht zur Bildung eines „Chromogens". Ist das letzere aber erst einmal entstanden, so sei angeblich selbst Siedehitze nicht imstande, die weitere Umwandlung desselben in den dunkeln Farbstoff hintanzuhalten.

2. Die Tyrosinase der Lepidopteren.

Als Ausgangsmaterial für die Mehrzahl unserer Versuche dienten uns Schmetterlingspuppen verschiedener Art, meistens solche der Species *Deiliphila elpenor* und *euphorbiae*. Bei vorsichtigem Anstechen und Ausdrücken einer solchen Puppe erhält man etwa 1 ccm einer hellgrün gefärbten, klaren Flüssigkeit. Des einfachen sprachlichen Ausdruckes wegen mag diese Körperflüssigkeit (Hämolymphe) im folgenden kurzweg als „Blut" bezeichnet werden, womit jedoch ihre morphologische und physiologische Bedeutung in keiner Weise charakterisiert werden soll.

*) L. c.

**) L. c., ferner: Weitere Beiträge zum Verständnis und zur Geschichte der Blutfarbstoffe bei den wirbellosen Tieren. Vergl. Studien, 1. Reihe, 5. Abt., S. 49 bis 57 (1881). Zur Kenntnis der Serumfarbstoffe. Sitzungsber. d. Jenaischen Gesellschaft f. Medizin u. Naturwissenschaft 1885.

Diese Flüssigkeit beginnt beim Stehen sich bereits innerhalb weniger Minuten von der Oberfläche her dunkel zu färben und nach einiger Zeit kommt es zur Abscheidung schwarzer scholliger Massen. Wird das frische Blut durch Kochen enteiweifst, so zeigt es beim Stehen keine Veränderung.

Wird das Blut sogleich nach der Entnahme in einen gut schliefsenden Exsikkator über Schwefelsäure gebracht und dieser evakuiert, so bleibt die Verfärbung gänzlich aus, und die Flüssigkeit trocknet zu einem Firnis ein. Wird dieser sodann in Wasser gelöst, so zeigt die grüne Lösung beim Stehen an der Luft keine weitere Veränderung. Wird das Blut mit so viel Alkohol versetzt, dafs der Gehalt der Flüssigkeit daran etwa 40 Proz. beträgt, so bleibt die Verfärbung nicht gänzlich aus, erscheint jedoch verzögert und abgeschwächt. Setzt man zwei Tropfen des frischen Blutes einerseits zu einigen Kubikcentimetern einer gesättigten Tyrosinlösung, andererseits zu Wasser, so bemerkt man nach kurzer Zeit an der Oberfläche der tyrosinhaltigen Lösung einen violetten Ring, der allmählich an Breite zunimmt und schliefslich erscheint die ganze Flüssigkeit dunkelviolett gefärbt und, infolge Abscheidung feinerer und gröberer Flöckchen, getrübt. Die Parallelprobe enthält gleichfalls Flöckchen, doch erscheint sie kaum merklich dunkler gefärbt, als sie es von vornherein war.

Der Einfluſs von verdünntem Alkali auf den Vorgang wurde durch folgenden Versuch festgestellt: Eine Serie von Probiergläsern wurde mit je 5 ccm einer 0,05 proz. wässerigen Tyrosinlösung, ferner mit einer innerhalb der einzelnen Proben zwischen 0 bis 5 ccm variierenden Menge von Natriumkarbonatlösung von 1 Proz., sowie mit soviel Wasser versetzt, dafs die Gesamtmenge der Flüssigkeit überall 10 ccm betrug. Sodann wurde mehreren Deiliphila-Puppen Blut entnommen, mit Wasser verdünnt und sogleich je 1 ccm des Gemenges jeder der Proben zugesetzt. Es ergab sich, dafs, wenn der Gehalt der Flüssigkeit 0,2 Proz. Natriumkarbonat oder mehr beträgt, die Verfärbung gänzlich ausbleibt; dagegen befördert ein Gehalt von 0,05 Proz. den Vorgang in hohem Grade, derart, dafs in den betreffenden Proben die dunkelviolette Färbung viel schneller und intensiver auftritt als in alkalifreien Pararallelproben. Analoge Serienversuche mit verdünnter Essigsäure ergaben einen hemmenden Einfluſs derselben, derart, dafs ein Gehalt daran von 0,05 Prozent bereits genügte, um den Vorgang der Dunkelfärbung gänzlich hintanzuhalten.

Zur Feststellung des Einflusses der Temperatur wurden eine Reihe von Proben mit je 10 ccm Tyrosinlösung von 0,05 Proz., $^1/_2$ ccm Sodalösung von 1 Proz. und mit je 1 ccm frischer verdünnter Hämolymphe angesetzt. Es ergab sich, dafs bereits eine Temperatur von 30° genügt, um den Verfärbungsvorgang zu verhindern. Ein merklich verzögernder Einfluſs der Eisschranktemperatur gegenüber der Zimmertemperatur wurde nicht bemerkt. Wurden die einige Zeit bei 30° oder einer höheren Temperatur gehaltenen Proben abgekühlt, so blieb auch hinterher die Verfärbung gänzlich aus.

Das verdünnte Blut giebt, mit etwas Guajaktinktur geschüttelt, erst bei längerem Stehen eine schmutzige, dunkelblaugrüne Färbung. Dagegen fällt die Spitzersche Reaktion deutlich positiv aus: wird etwas wässerige, alkalihaltige Paraphenylendiaminlösung mit zwei Tropfen alkoholischer α-Naphtollösung und einem Tropfen frischen Insektenblutes geschüttelt, so erfolgt die Bildung eines violettroten, mit Chloroform leicht extrahierbaren Farbstoffes.

Die mitgeteilten Beobachtungen führten zu der Annahme, dafs das Lepidopterenblut ein Enzym enthält, das befähigt ist, Tyrosin, ebenso wie auch ein im Blute selbst vorkommendes Chromogen, bei Gegenwart von Sauerstoff zu dunkel gefärbten Produkten umzuwandeln.

3. Eigenschaften der Lepidopteren-Tyrosinase.

Die Bemühungen, die Tyrosinase aus der Hämolymphe durch Alkoholfällung sowie nach dem Verfahren Jacobys*) durch Fällung mit Uranylacetat aus alkalischer Lösung zu isolieren, blieben erfolglos. Dagegen gelang die Abtrennung des Enzyms vom Chromogen und von den krystalloiden Substanzen des Blutes mit Hülfe der fraktionierten Salzfällung.

Die Hämolymphe einer Anzahl von Deiliphila-Puppen wurde in einer abgemessenen Menge halbgesättigter, neutraler Ammonsulfatlösung aufgefangen und mit so viel einer gesättigten Ammonsulfatlösung versetzt, dafs die Flüssigkeit nachher wieder halb gesättigt erschien. Der entstandene Niederschlag wurde sogleich abfiltriert, mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, zwischen Filtrierpapier scharf abgepreſst und schliefslich in Natriumkarbonatlösung von 0,05 Proz. gelöst. In der so gewonnenen eiweifshaltigen Lösung fanden sich relativ reichliche Mengen von Tyrosinase.

*) Martin Jacoby, Über das Aldehyde oxydierende Ferment der Leber und Nebenniere (aus dem physiol.-chem. Institut zu Strafsburg), Zeitschr. f. physiol. Chem. (1900) 30, 134.

Während die so erhaltene Fermentlösung als solche oder nach Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung, vorausgesetzt, dafs der vorerwähnte Niederschlag gut ausgewaschen worden war, nicht nachdunkelte, wurde nach Zusatz einer Tyrosinlösung und Umschütteln bald eine violette Färbung bemerkbar und nach kurzer Zeit erschien die Flüssigkeit dunkelviolett und schliefslich schwarz. Nach längerem Stehen setzte sich das neu entstandene Produkt in Form schwarzer Flocken ab, während die überstehende Flüssigkeit klar und farblos erschien und sich, abgehoben und neuerdings mit Tyrosinlösung versetzt, nicht weiter veränderte. Von den Eigenschaften des dunkel gefärbten Umwandlungsproduktes soll später die Rede sein.

Einige Versuche ergaben, dafs sich die Wirkung dieses Enzyms keineswegs auf das Tyrosin beschränkt, sondern, wie zu erwarten war, auch anderen leicht oxydablen Substanzen aromatischer Natur gegenüber offenbart.

Wird eine wie oben bereitete Fermentlösung mit einer Messerspitze reinen Brenzkatechins versetzt, so färbt sich die Flüssigkeit nach kurzer Zeit erst gelblichrot, dann rotbraun und schliefslich setzt sich ein schwarzbrauner Niederschlag ab. Das Filtrat erscheint rotgelb und giebt den Farbstoff nicht an Äther ab.

Auf Zusatz von Hydrochinon entsteht schnell eine Rotfärbung, dann eine Trübung und nach einigen Stunden hat sich ein reichlicher brauner Niederschlag abgesetzt.

Weiter wurde eine Eisenverbindung des Suprarenins, des blutdrucksteigernden, sehr leicht oxydablen Bestandteiles der Nebennieren, über deren Darstellung der eine von uns gleichzeitig in dieser Zeitschrift*) berichtet, in Sodalösung von 0,05 Proz. gelöst und die schön karminrote Flüssigkeit mit der Fermentlösung versetzt. Nach zwei Stunden erschien die Flüssigkeit schmutzigbraun und getrübt, während die Kontrollproben keine Veränderung zeigten.

Von besonderem Interesse erscheint schliefslich eine gelegentliche Beobachtung an einer schön krystallisierenden, von Dr. Emerson bei Autodigestion des Pankreas gewonnenen aromatischen Substanz, welche sich als Oxyphenyläthylamin ergab**). Einige Kryställchen derselben, die Herr Dr. Emerson uns freundlichst

*) Siehe die nachfolgende Mitteilung.

**) Näheres bringt eine demnächst erscheinende Publikation von Herrn Dr. Emerson.

zur Verfügung stellte, wurden in einigen Kubikcentimetern Natriumkarbonat von 0,05 Proz. gelöst und die Lösung nach Zusatz der fermenthaltigen Flüssigkeit geschüttelt; fast augenblicklich bemerkte man das Auftreten einer gelblichbraunen Färbung sowie auch einer Trübung und bald setzte sich ein olivenfarbener Niederschlag ab.

Um zu konstatieren, ob die Tyrosinase vielleicht auch imstande sei, den noch im Verbande des intakten Eiweifsmoleküls enthaltenen aromatischen Komplex anzugreifen, wurde ein reines Präparat von Kaseïn der Einwirkung einer sehr wirksamen Fermentlösung bei Gegenwart einer passenden Menge Alkali ausgesetzt. Doch konnte keinerlei Veränderung bemerkt werden.

4. Das Chromogen des Lepidopterenblutes.

Es ergab sich nunmehr die weitere Frage, welcher Natur denn das im Insektenblute enthaltene Chromogen sei, insbesondere ob es sich um Tyrosin als solches, oder aber um eine andere aromatische Substanz handle.

Die Hämolymphe von 30 Deiliphila-Puppen wurde in heifsem Wasser aufgefangen, aufgekocht und filtriert, das klare eiweifsfreie Filtrat sodann mit einem Überschufs salzsäurehaltiger Phosphorwolframsäure gefällt. Der mit verdünnter Phosphorwolframsäure ausgewaschene Niederschlag wurde mit Barythydrat eine halbe Stunde am Wasserbade erhitzt, filtriert, der Barytüberschufs durch Einleiten von Kohlensäure und Eindampfen beseitigt, das schwach alkalische Filtrat mit Salzsäure neutralisiert und auf das Volumen von 10 ccm gebracht (*A*). Die barytfreie Lösung gab keine Biuretreaktion. Phosphorwolframsäure erzeugte darin einen sehr reichlichen grobflockigen, in der Wärme löslichen, beim Erkalten wieder ausfallenden Niederschlag. Auch Quecksilberacetat gab eine reichliche Fällung, nicht aber Quecksilberchlorid, Jodquecksilber-Kalium, Kupfersulfat, Bleizucker, Bleiessig und ammoniakalische Silberlösung.

Das Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung wurde zum Zwecke der Beseitigung der Phosphorwolframsäure mit einer Lösung von krystallisiertem Eieralbumin und etwas Salzsäure versetzt, der Niederschlag abfiltriert, das Filtrat mit Natronlauge neutralisiert und die auftretende spärliche Fällung entfernt. Die so erhaltene klare, farblose, weder durch Phosphorwolframsäure noch durch Eiweifslösung fällbare Flüssigkeit wurde gleichfalls auf das Volumen von 10 ccm gebracht (*B*).

Nunmehr wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren eine Fermentlösung aus dem Blute von zehn Deiliphila-Puppen frisch bereitet und je 2 ccm derselben mit dem gleichen Volumen der Lösungen *A* und *B* versetzt; jeder Probe wurden aufserdem 2 ccm einer Sodalösung von 0,05 Proz. hinzugefügt. Die Proben von *B* nahmen inner-

halb einer Viertelstunde eine dunkelschiefergraue Färbung an und am nächsten Tage hatte sich ein reichlicher dunkler Niederschlag abgesetzt: die Proben von *A* waren dagegen unverändert geblieben. Es folgt daraus, dafs das Chromogen durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt wird.

Zum Zwecke weiterer Fraktionierung wurde eingeengt, das mehrfache Volumen Alkohol und etwas Aether hinzugefügt, der reichliche weifse Niederschag mit Alkohol gewaschen und in 6 ccm Wasser gelöst (*C*), das Filtrat wurde eingedampft, und der Rückstand in 6 ccm Wasser aufgenommen (*D*). *C* und *D* wurden nun wiederum wie oben mit frisch bereiteter Fermentlösung in Bezug auf ihren Chromogengehalt verglichen und es ergab sich, dafs *C* gar kein Chromogen, *D* jedoch reichliche Mengen davon enthielt. Weder in *C* noch in *D* war auch nur eine Spur von Tyrosin durch die so sehr empfindliche Millonsche Reaktion nachweisbar. Lösung *D* gab mit Schwermetallsalzen, auch mit Quecksilberacetat und ammoniakalischer Silberlösung keinen Niederschlag, ebenso wenig mit starkem Bromwasser. Auf die Gegenwart einer aromatischen Substanz deutete das Auftreten einer Gelbfärbung beim Kochen mit Salpetersäure, die beim Übersättigen mit Ammoniak in ein intensives Orange umschlug. Lösung *C* zeigte keine Spur dieses Verhaltens.

Es ergiebt sich sonach, dafs das Chromogen des Lepidopterenblutes als eine weder durch Phosphorwolframsäure, noch durch Schwermetallsalze, ammoniakalische Silberlösung oder Bromwasser fällbare, in wasserhaltigem Alkoholäther lösliche, anscheinend der aromatischen Reihe angehörende, jedenfalls nicht mit dem Tyrosin identische Substanz anzusehen ist.

5. Das durch Tyrosinase aus Tyrosin entstehende Melanin.

Als nächste Aufgabe ergab sich die genauere Feststellung der Natur jenes Umwandlungsproduktes, das durch Einwirkung des besprochenen Enzymes auf Tyrosin entsteht.

Zu diesem Zwecke wurden nach dem beschriebenen Verfahren Fermentlösungen bereitet, derart, dafs das Volumen einer solchen, entsprechend einem Ausgangsmaterial von je 20 bis 40 Deiliphila-Puppen, 10 bis 20 ccm betrug. Die frisch bereitete Fermentlösung wurde sogleich mit einigen Decigramm reinen, fein gepulverten Tyrosins versetzt und im Schüttelapparate vier bis sechs Stunden kräftig geschüttelt. Schon nach kurzer Zeit stellte sich die charakteristische Violettfärbung ein und nach einiger Zeit hatte sich ein reichlicher schwarzer Niederschlag abgesetzt, während die überstehende Flüssigkeit klar und farblos erschien und bei weiterem Schütteln mit Tyrosin keine Farbenveränderung mehr zeigte.

Bei näherer Untersuchung ergab es sich, dafs die schwarzen Flocken in ihrem Inneren erhebliche Mengen unveränderten Tyrosins

einschlossen. Da es sich zeigte, dafs durch die Einwirkung verdünnter Alkalien bei Zimmertemperatur eine völlige Beseitigung des Tyrosins nicht erzielt werden konnte, wurde der auf einem gehärteten Filter gesammelte und mit Wasser gewaschene Niederschlag mit verdünnter Natronlauge oder mit Ammoniak längere Zeit am Wasserbade erhitzt, wobei ein anscheinend nicht erheblicher Teil desselben in Lösung ging. Die schwarzen ungelösten Flocken wurden sodann auf ein gehärtetes Filter gebracht, erst mit viel Wasser, dann mit verdünnter Salzsäure, dann mit heifsem Wasser chlorfrei, schliefslich mit Alkohol und Äther gewaschen und bei 110° zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Das so erhaltene schwarze Pulver erwies sich als unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther und den üblichen organischen Lösungsmitteln sowie in verdünnten Alkalien bei Zimmertemperatur und sogar auch in kochender, starker Salzsäure.

Eine kleine Menge eines solchen Präparates mit reinstem Ätznatron geschmolzen (Natrium hydroxydatum e Natrio metallico) entwickelte einen unverkennbaren indol- und skatolartigen Geruch.

Bereits früher hatte der eine von uns (Schneider) festgestellt, dafs, wenn reines Tyrosin unter gewissen Vorsichtsmafsregeln mit Ätzkali geschmolzen wird, eine nach Skatol riechende Substanz dabei entsteht.

Die Elementaranalyse ergab für die Substanz die Zusammensetzung

C	55,44	Proz.
H	4,45	„
N	13,74	„

Derselben kann jedoch nur ein orientierender Wert beigemessen werden. Weitere Bestimmungen unterblieben, da vier Präparationen mit einem Aufwande von etwa 120 Deiliphila-Puppen im ganzen eine Ausbeute von kaum 0,2 g analysenfähiger Substanz ergeben hatten.

Berechnet man aus obiger Analyse das Verhältnis zwischen Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff, so ergiebt sich

$$N : H : C = 1 : 4{,}55 : 4{,}77.$$

Es ist dies ein Atomverhältnis, das, Prof. Hofmeisters in seinen Vorlesungen geäufserten Anschauungen entsprechend, wie der eine*) von uns bereits bei anderer Gelegenheit auseinanderzusetzen Gelegenheit hatte, für eine ganze Anzahl von gewöhn-

*) v. Fürth, Über die Einwirkung von Salpetersäure auf Eiweifsstoffe. Strafsburg 1899.

lich als Melanine bezeichneten Farbstoffen charakteristisch zu sein scheint. Hierher gehören bekanntlich z. B. die dunkeln Pigmente der Haare, der Haut, der Chorioidea, der melanotischen Tumoren, das Sepienschwarz und insbesondere auch gewisse bei der Eiweifsspaltung auftretende Produkte (Melaninsäure von Schmiedeberg).

Man ist um so mehr berechtigt, das in Rede stehende Umwandlungsprodukt des Tyrosins diesen „Melaninen" beizuzählen, als es sich durch seine physikalischen Eigenschaften, seine Lösungsverhältnisse, insbesondere aber durch die Fähigkeit, bei der Alkalischmelze skatolartig riechende Substanzen zu liefern, in jeder Hinsicht diesen Gruppen angliedert.

Erst nachdem die mitgeteilten Untersuchungen zum gröfsten Teile zum Abschlufs gekommen waren, gelangte eine aus der jüngsten Zeit stammende Arbeit von Ducceschi*) zu unserer Kenntnis, aus der wir entnehmen, dafs es dem Autor gelungen ist, durch vorsichtige Oxydation von Tyrosin mit chlorsaurem Kali in salzsaurer Lösung eine in ihrem Aussehen und ihren Lösungsverhältnissen den Melaninen ähnliche, bei der Kalischmelze einen indol- und skatolähnlichen Geruch entwickelnde Substanz von der Zusammensetzung

C	52,19	Proz.
H	4,75	„
N	6,43	„

darzustellen.

Die Feststellung, dafs das Tyrosin durch gelinde Oxydation unter gewissen Verhältnissen zu melaninartigen Produkten umgewandelt werden kann, dürfte, wie auch Ducceschi*) mit Recht betont, für die Beurteilung jener Vorgänge, die bei der Säurespaltung und Verdauung von Eiweifskörpern zur Bildung einerseits von Melaninen, andererseits von eigentümlichen indol- oder skatolgebenden Produkten führen, nicht ohne Bedeutung sein.

Hinsichtlich der Natur des von Ducceschi analysierten Produktes ist jedoch zu bemerken, dafs sich dasselbe von dem durch Fermentwirkung aus Tyrosin entstandenen Melanin insofern sehr wesentlich unterscheidet, als es nicht, wie das letztere, in seiner

*) V. Ducceschi, Sulla natura delle Melanine e di alcune sostanze ad esse affini. Roma. Rendiconti della R. Accademia dei Lincei. Seduta del 3. marzo 1901.

Zusammensetzung dem als für Melanine charakteristisch erkannten Atomverhältnis von ungefähr

$$N : H : C = 1 : 5 : 5$$

nahe kommt, vielmehr eine Relation

$$N : H : C = 1 : 10{,}3 : 9{,}4$$

aufweist, sich sonach von den Verhältnissen des Tyrosins

$$N : H : C = 1 : 11 : 9$$

nicht allzu weit entfernt.

Was die Natur jenes auch von rein chemischen Gesichtspunkten aus bemerkenswerten Vorganges betrifft, der die fermentative Umwandlung von Tyrosin in eine nahezu doppelt so stickstoffreiche, zur Indolgruppe in näherer Beziehung stehende Substanz bewerkstelligt, wird man wohl schwerlich fehlgehen, wenn man annimmt, dafs sich dabei eine Kondensation von mindestens zwei Tyrosinmolekülen zu einem gröfseren Komplexe und Abspaltung stickstoffarmer oder stickstofffreier Gruppen abspielen dürfte. Wir betrachten das genauere Studium der durch Fermentwirkung aus verschiedenen Substanzen der aromatischen Reihe entstehenden melaninartigen Produkte als unsere nächste Aufgabe.

6. Einiges über die Verbreitung der tierischen Tyrosinase.

Die Tyrosinasen sind in ihrem Vorkommen im Tierreiche nicht nur auf die Klasse der Insekten beschränkt. Bei Verarbeitung des Blutes einiger Flufskrebse nach dem beschriebenen Verfahren gelang es leicht, eine Fermentlösung zu gewinnen, die zwar relativ schwach, immerhin aber deutlich auf Tyrosinlösung einwirkte. Bei Anwendung verfeinerter Methoden dürfte es vielleicht gelingen, im Organismus von Vertretern der verschiedensten Tierklassen das Vorkommen von Tyrosinasen nachzuweisen.

Von besonderem Interesse schien uns die Feststellung, ob nicht vielleicht Tyrosinasen bei der physiologischen Bildung zur Melaningruppe gehöriger Pigmente im lebenden Organismus eine wesentliche Rolle spielen.

Nun ist die Entstehung solcher Pigmente im normalen Wirbeltier-Organismus, wie die Entstehung der dunklen Farbstoffe der Haut, der Haare, der Chorioidea, eine so aufserordentlich langsame, dafs Versuche, die Mitwirkung von Tyrosinase bei diesen Vorgängen experimentell nachzuweisen, wenig Erfolg zu versprechen schienen.

Viel mehr Aussicht bot von vornherein die Untersuchung solcher Organe niederer Tiere, deren Hauptfunktion die stetige Produktion dunkler Pigmente bildet. Die Cephalopoden besitzen in ihren Tintenbeuteln drüsige Organe solcher Art, deren Sekret, das Sepiapigment, nach den Untersuchungen von Girod, Nencki und Sieber u. a. seiner Zusammensetzung und seinem chemischen Verhalten gemäfs für den Typus eines Melanins gelten kann und in denen der Prozefs der physiologischen Melaninbildung sich stetig mit grofser Lebhaftigkeit abspielt.

Ein Versuch, den Herr Dr. Hans Przibram unseren Wünschen gemäfs an der zoologischen Station in Triest auszuführen die besondere Freundlichkeit hatte, ergab in schlagender Weise die Berechtigung unserer Vermutungen über die Beteiligung von Fermenten bei der physiologischen Pigmentbildung.

Dr. Przibram berichtet über den Versuch in folgender Art:

„Zwei frisch eingebrachte Exemplare von Sepia officinalis wurden so lange gereizt und jedesmal das Wasser gewechselt, bis keine Trübung desselben mehr eintrat, was etwa eine halbe Stunde in Anspruch nahm. Sodann wurden sie durch einen Schnitt ins Gehirn getötet, auf den Rücken gelegt und der Mantel auf der linken Seite durchtrennt; der blofsliegende Tintenbeutel wurde dann losgelöst und ausgedrückt, dann noch längs aufgeschnitten und so lange ausgewaschen, bis keine Trübung der dazu angewendeten physiologischen Kochsalzlösung mehr eintrat. Die so erhaltenen Beutelhäute wurden unter Zusatz von Quarzsand und physiologischer Kochsalzlösung nach vorausgegangenem Zerhacken mit dem Wiegemesser im Mörser zerrieben. Der erhaltene, trotz allen Auswaschens von dunklen Körnern durchsetzte Brei wurde zweimal durch Barytfilter filtriert und ergab eine fast vollkommen klare, sehr schwach grau gefärbte Flüssigkeit. Während die mit physiologischer Kochsalzlösung zur Hälfte versetzten Proben keine Veränderung (als viel. leicht eine sehr schwache Opaleszenz) zeigten, nahmen die zur Hälfte mit Tyrosinlösung versetzten bald eine safrangelbe bis orangerote, sehr schöne Färbung an und wurden endlich sepiabraun, einen schwarzen Niederschlag absetzend."

Wir sind daher berechtigt, die Existenz einer Tyrosinase in dem secernierenden Gewebe des Tintenbeutels von Sepia anzunehmen und es drängt sich die Vermutung auf, dafs vielleicht überall dort, wo in den lebenden Geweben höherer oder niederer Tiere die Bildung melaninartiger Pigmente stattfindet, dieselben der Einwirkung eines eigentümlichen Enzyms auf Substanzen aro-

matischer Natur ihre Entstehung verdanken. Bereits Salkowski, der die Autodigestionsvorgänge tierischer Gewebe entdeckte und im Verein mit seinen Schülern näher studiert hat, betonte das Vorkommen von Tyrosin unter den hierbei entstehenden Spaltungsprodukten. Martin Jacoby*) beobachtete bei der Autolyse der Leber das Auftreten einer die Tryptophanreaktion gebenden, jedenfalls der aromatischen Gruppe angehörenden Substanz; er wies ferner die Entstehung reichlicher Mengen von Tyrosin in der aseptisch entnommenen Leber nach und machte es wahrscheinlich, dafs der autolytische Eiweifszerfall sich auch während des Lebens vollzieht.

Es drängt sich daher die Vermutung auf, dafs die physiologische Bildung melaninartiger Pigmente in den tierischen Geweben auf das Zusammenwirken von zweierlei Fermenten zurückzuführen sei: durch ein autolytisches Ferment könnte ein aromatischer Komplex aus dem Eweifsmaterial abgespalten und dieser sodann durch eine Tyrosinase in ein Melanin übergeführt werden.

Es wird unsere Aufgabe sein, an geeignetem Material einerseits das Zusammenwirken von autolytischen Fermenten und Tyrosinasen zu studieren, andererseits aber das Auftreten von Tyrosinasen im tierischen Organismus unter pathologischen Verhältnissen, insbesondere bei der Bildung melanotischer Tumoren, zu verfolgen.

Strafsburg, Juli 1901.

---

*) Martin Jacoby, Über die fermentative Eiweifsspaltung und Ammoniakbildung in der Leber (aus dem physiol.-chem. Institut zu Strafsburg). Zeitschr. f. physiol. Chem. (1900) 30, 149 bis 173.

XIV.

Zur Kenntnis des Suprarenins.

Von Privatdozent Dr. **Otto v. Fürth,**
Assistent am physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

Die im Folgenden mitgeteilten Beobachtungen bilden die Fortsetzung einer Reihe von Untersuchungen über die Natur des blutdrucksteigernden Bestandteiles der Nebennieren, des Suprarenins, deren Ergebnisse ich früher in der Zeitschrift für physiologische Chemie*) mitgeteilt habe.

Da es sich gezeigt hatte, dafs es gelingt, das Suprarenin in eine haltbare Eisenverbindung überzuführen, bemühte ich mich zunächst, etwas Näheres über die Natur derselben zu ermitteln.

Zur Darstellung der Eisenverbindung erwies sich nach mannigfachen Versuchen nachstehendes Verfahren als geeignet:

Frische, zerkleinerte Rindsnebennieren wurden wiederholt mit salzsäurehaltigem Wasser unter Zusatz von Zinkstaub ausgekocht. Die filtrierte Extraktionsflüssigkeit wurde eingedampft, der Rückstand mit Methylalkohol ausgezogen; die filtrierte goldgelbe, grünlich fluoreszierende Lösung mit einem Überschufs methylalkoholischer Chlorzinklösung gefällt, das Filtrat mit einer konzentrierten Natriumkarbonatlösung bis zur deutlich alkalischen Reaktion und sodann mit dem doppelten Volumen Aceton versetzt, der entstandene Niederschlag abfiltriert, die Flüssigkeit nunmehr tropfenweise mit Ammoniak und (nach Entfernung einer etwa entstandenen, vielleicht von einem Epinephrinrest herrührenden Fällung) mit Eisenchlorid versetzt, wobei die Eisenverbindung des Suprarenins sich in Form karminroter Flocken abschied. Die Fällung wurde sogleich auf einem Saugfilter gesammelt, mit Aceton und Alkohol gut gewaschen, sodann in einem kleinen Volumen verdünnten Ammoniaks gelöst, die karminrote Lösung filtriert und durch Zusatz des doppelten Volumens Aceton gefällt, letzterer Vorgang eventuell wiederholt, der Niederschlag schliefslich auf ein gehärtetes Filter gebracht, mit Aceton, Alkohol und Äther sorgfältig aus-

*) Zeitschrift für physiol. Chemie 24, 142 bis 153. Ebenda 26, 14 bis 47. Ebenda 29, 105 bis 123.

gewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Das nach diesem Verfahren in einer Ausbeute von 0,5 bis 1,5 g aus je 100 Rindsnebennieren gewonnene Präparat bildet ein trockenes, feines, violettes, im trockenen Zustande anscheinend unbegrenzt haltbares Pulver von ausgesprochen piperidinartigem Geruch. Dasselbe ist schwer löslich in Wasser, kaum löslich in Alkohol, Äther, Aceton, Petroläther u. s. w., leicht löslich in Säuren und Alkalien. Die neutrale wässerige Lösung erscheint blau gefärbt; auf Zusatz von Natrium- oder Ammoniumkarbonat erfolgt Umschlag in ein prachtvolles Karminrot*). Bei allmählichem Zusatz von verdünnter Essigsäure oder Salzsäure tritt nach dem Erscheinen blauer Zwischentöne eine smaragdgrüne Färbung auf, die bei Anwesenheit eines gröfseren Überschusses freier Salzsäure zu einem hellen Weingelb verblafst. Oxalsäure, saures oxalsaures Kali, Weinsäure, saures weinsaures Natron und Zitronensäure lösen mit gelber (bezw. grünlich- oder bräunlich-gelber) Farbe, Zusatz von Natriumkarbonat bewirkt Karminfärbung, jedoch ohne Auftreten blauer Zwischentöne. Bernsteinsäure löst mit schön meergrüner Farbe. Nur die gelben, sauren Lösungen erweisen sich als haltbar; mit solchen angestellte Krystallisationsversuche blieben resultatlos.

Eine Lösung der Substanz reduziert ammoniakalische Silberlösung sehr kräftig. Auf Zusatz von Bromwasser tritt beim Stehen eine schöne, rotviolette Färbung auf. Beim Eindunsten bleibt eine schwarze, in Wasser, Alkohol und Äther unlösliche, in Ammoniak schwer, in Natronlauge sowie in saurem Alkohol leicht lösliche, aus ihren Lösungen durch Neutralisation fällbare Substanz zurück.

Wird die essigsaure, smaragdgrüne Lösung mit etwas Jodwasser versetzt und erwärmt, so nimmt sie von der Oberfläche her eine schön burgunderrote Färbung an, die auf Zusatz von Natriumkarbonat in violett umschlägt und beim Ansäuern mit Salzsäure verblafst.

Die neutrale oder schwach salzsaure Lösung des Präparates wird, zum mindesten in den von mir angewandten Konzentrationen, weder von Phosphorwolframsäure, noch von Phosphormolybdän-

*) Der kolorimetrische Vergleich von alkalischen Lösungen der Suprarenineisenverbindung mit analogen eisenhaltigen Brenzkatechinlösungen ergab für die letzteren eine ungefähr drei bis dreieinhalb Mal gröfsere Färbekraft als für die ersteren; die in einer früheren Publikation (Zeitschrift für physiol. Chemie 29, 116) für den Suprareningehalt der Nebenniere angegebenen Schätzungswerte müssen also eine entsprechende Multiplikation erfahren.

säure, Pikrinsäure oder Jodquecksilberkalium gefällt*). (Es enthält also keine Epinephrinbeimengung.)

Bei der Kalischmelze eines solchen Präparates konnte weder ein Geruch nach Indol oder Skatol, noch ein solcher nach Pyridin oder Pyrrol wahrgenommen werden.

Konzentrierte Salpetersäure löst die Eisenverbindung unter lebhafter Gasentwickelung und Bildung eines gelb (in alkalischer Lösung orange) gefärbten, in Alkohol, Äther, Aceton und Chloroform kaum, in Wasser leicht löslichen, durch ammoniakalisches Bleiacetat fällbaren Umwandlungsproduktes.

Suprarenin verhält sich konzentrierten Halogenwasserstoffsäuren gegenüber selbst in der Wärme sehr resistent. Durch mehrstündiges Erhitzen der Eisenverbindung mit Jodwasserstoffsäure (spez. Gew. 1,7) unter Zusatz von rotem Phosphor im zugeschmolzenen Rohre auf 235° erhält man jedoch eine farblose, wasserhelle Flüssigkeit, in der kein unverändertes Suprarenin mehr nachweisbar ist. Wird dieselbe alkalisch gemacht und mit Äther ausgeschüttelt, so erhält man nach Abdunsten des letzteren unter Zusatz von etwas Salzsäure eine sehr geringe Menge einer durch Phosphorwolframsäure und Jodquecksilberkalium, nicht aber durch Platinchlorid fällbaren Substanz in Form einer rötlichen, amorphen Masse, die nach Zusatz von Natronlauge einen penetranten, an Pyridin oder Piperidin erinnernden Geruch entwickelt.

Durch Destillation erhält man aus der mit Natronlauge übersättigten Flüssigkeit eine geringe, nur einem Bruchteile des Gesamtstickstoffs entsprechende Menge von Ammoniak**) (als Platinchloridverbindung durch Krystallform und Platingehalt identifiziert: Pt gefunden 43,35 Proz., berechnet 43,89 Proz.).

Wurde die Eisenverbindung mit so viel absolut alkoholischer Salzsäure übergossen, als zur Bindung des Eisens erforderlich war,

---

*) Die Nichtfällbarkeit des Suprarenins durch Alkaloidfällungsmittel wird von Abel in seiner letzten Mitteilung (Further Observations on Epinephrin. John Hopkins Hospital Bulletin 12, No. 120, March 1901) bestätigt. Bei nicht gelungener Präparation erhält man oft Eisenniederschläge, die infolge Beimengung einer Verunreinigung oder eines Zersetzungsproduktes mit Alkaloidfällungsmitteln harzige Niederschläge geben. Nach Abel wäre die von ihm dargestellte alkaloidartige Substanz, das Epinephrin, als Spaltungsprodukt des Suprarenins aufzufassen.

**) Dieses Verhalten erinnert an dasjenige des Coniins, mit dem das Suprarenin auch sonst gewisse Analogieen aufweist. Das Coniin (Propylpiperidin) spaltet beim Erhitzen mit Jodwasserstoffsäure und Phosphor auf 300° glatt Ammoniak ab.

und das mehrfache Volumen Äther zugefügt, so schied sich freies Suprarenin in Form einer syrupösen Masse ab, die nach Waschen mit Äther und Petroläther und nach dem Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure spröde und zerreiblich wurde. Dieselbe gab die bekannten Reaktionen und enthielt nur Spuren von Eisen.

Auch durch Zersetzung des Eisenniederschlages mit Schwefelwasserstoff, Eindampfen des dunkeln Filtrats und Lösen des Rückstandes in Wasser konnte freies Suprarenin erhalten werden. Mit demselben angestellte Krystallisationsversuche führten zu keinem befriedigenden Erfolge.

Die Eisenpräparate erwiesen sich, auf ihren blutdrucksteigernden Effekt geprüft, als ganz aufserordentlich wirksam. Fünf Milliontel Gramm der Eisenverbindung, entsprechend etwa vier Milliontel Gramm des freien Suprarenins, einem 7 kg schweren Hunde injiziert (also entsprechend einer Dosis von etwa 0,6 Milliontel Gramm pro Kilo Körpergewicht) bewirkten eine Blutdrucksteigerung von 14 mm; ferner eine Dosis von 3,6 Milliontel Gramm Suprarenin pro Kilo Körpergewicht eine Drucksteigerung von 64 mm Hg*).

Bei subkutaner Applikation, durch welche bekanntlich frühere Beobachter überhaupt keine Beeinflussung des Blutdruckes zu erzielen vermochten, sah ich bei einem Kaninchen nach Injektion der allerdings verhältnismäfsig grofsen Dosis von 0,08 g im Verlaufe einer halben Stunde langsam eine Blutdruckerhöhung um 71 mm Hg eintreten.

Die Giftigkeit des Präparates bei der Applikation per os schien keine allzu grofse zu sein. Wenigstens zeigte sich bei einem Hund, dem ein Dezigramm Suprarenineisen mittels Schlundsonde beigebracht worden war, im Laufe einer Woche keine auffällige Gesundheitsstörung; allerdings hatte das Tier einen Teil der Lösung einige Stunden nach der Beibringung ausgebrochen.

Die Analyse von vier nach dem eben mitgeteilten Verfahren dargestellten Eisenfällungen ergab einen sehr wechselnden Eisengehalt derselben (14,18 bis 22,49 Proz.). Auf eisenfreie Substanz

*) Der Umstand, dafs ich bei den in meiner letzten einschlägigen Publikation veröffentlichten Versuchen mit der Veränderlichkeit der neutralen oder alkalischen Suprarenineisenlösungen noch nicht bekannt gewesen war, infolge dessen die Wirksamkeit derselben viel zu niedrig gefunden hatte, veranlafste Moore und Purinton (Pflügers Archiv, 81. Bd., S. 487) zur irrigen Annahme, dafs meine Eisenverbindungen nur eine Beimischung des wirksamen Prinzips enthalten, welches beim Niederschlagen rein mechanisch zu Boden gerissen werde.

berechnet ergab sich ein Gehalt an Kohlenstoff von 47,15 bis 51,59 Proz., an Wasserstoff von 5,74 bis 6,35 Proz., an Stickstoff von 6,72 bis 7,94 Proz. Die Eisenniederschläge können also vom chemischen Gesichtspunkte aus noch lange nicht für einheitlich gelten. Berechnet man aus den Analysen das Verhältnis der einzelnen Elemente zu einander, so ergiebt sich

$$N:H:C = 1:10{,}4 \text{ bis } 12{,}1:7{,}2 \text{ bis } 8{,}5^{*})$$
$$\text{Mittel } 11{,}3 \qquad \text{Mittel } 7{,}7$$

Nach den Ergebnissen dieser Analysen kann ich an der vorläufig ausgesprochenen Vermutung, dafs es sich um ein Di- oder Tetrahydrodioxypyridin handeln dürfte, nicht festhalten. Die Substanz ist kohlenstoffreicher und vermutlich ist ihr Molekül ein gröfseres, worauf auch die im Vergleich zum Brenzcatechin geringere Färbekraft ihrer Eisenverbindung hinweist.

Krystallinisches Benzoylprodukt aus der Eisenverbindung des Suprarenins. Als nächstliegender Weg zur Darstellung chemisch einheitlicher Suprareninderivate ergab sich der Versuch der Überführung der Eisenverbindung in ein Acetyl- oder Benzoylderivat.

Da Acetylierungsversuche mir keine befriedigende Ausbeute ergaben, glaubte ich, angesichts der Spärlichkeit des mir zu Gebote stehenden Ausgangsmaterials, von weiteren Experimenten in dieser Richtung um so eher absehen zu können, als Abel in seiner letzten Publikation die Ausführung von Analysen dieser Art in Aussicht stellt**).

---

*) Ich möchte nicht unerwähnt lassen, dafs ein nach einem anderen Verfahren dargestellter Eisenniederschlag (Fällung des Suprarenins als Zinkverbindung und Überführung derselben in die Eisenverbindung durch Fällung mit Eisenchlorid und Natriumkarbonat aus methylalkoholischer Lösung, jedoch ohne vorherige Beseitigung der durch Chlorzink fällbaren Substanzen) ein von der obigen Relation stark abweichendes Verhältnis ($C_{5,6}H_6NO_{1,8}$) ergab, welches auffallenderweise mit der Zusammensetzung einer Acetylverbindung übereinstimmt, die ich seinerzeit auf dem Umwege der Zinkfällung gewonnen hatte ($C_{5,4}H_7NO_{1,9}$, berechnet unter der allerdings nicht über jeden Zweifel erhabenen Voraussetzung, dafs es sich wirklich um eine Triacetylverbindung handelt).

**) Abel erhielt, wie er vorläufig mitteilt, durch Acetylierung von Suprarenineisenverbindungen, die nach dem von mir angegebenen Verfahren dargestellt worden waren, niedrigere Stickstoffwerte (4,18 bis 4,24 Proz.), als ich seinerzeit bei Acetylierung von Rohextrakten gefunden hatte (5,11 bis 6,20 Proz.).

Eine Reihe von Benzoylierungsversuchen führten anfänglich zu amorphen Produkten von wechselnder Zusammensetzung [C 67,46 bis 71,36 Proz., H 4,80 bis 6,63 (?) Proz., N 2,62 bis 2,97 Proz.]. Schliefslich gelang es mir, indem ich, einem Rate Herrn Prof. Hofmeisters folgend, die Benzoylierung durch direktes Erhitzen mit Benzoylchlorid unter Zusatz von Magnesiumoxyd durchführte, zu einem krystallinischen Produkte zu gelangen.

$1^1/_2$ g der Eisenverbindung wurden unter Zusatz von 3 g Magnesia und 10 ccm reinsten Benzoylchlorids drei Stunden im Wasserbade erhitzt, die dunkle Flüssigkeit nach dem Erkalten mit Äther verdünnt, filtriert, mit Äther nachgewaschen und mit Petroläther gefällt, der syrupöse Bodensatz wiederholt mit Petroläther gewaschen, der Petroläther im Vakuum entfernt. Der Syrup, mit Wasser geknetet, erhärtete beim Stehen unter verdünnter Natronlauge. Die Substanz wurde nunmehr mit 10proz. Salzsäure nahezu eisenfrei, mit Wasser chlorfrei gewaschen, im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, gepulvert, in $^1/_2$ Liter kochenden 95proz. Alkohols gelöst, die Lösung filtriert, sodann bis zur beginnenden Trübung mit Wasser versetzt und ins Vakuum über Schwefelsäure gestellt. Nach einer Woche hatte sich in der auf ein geringes Volumen eingeengten, getrübten Flüssigkeit ein reichlicher, körnig krystallinischer Niederschlag abgesetzt. Dieser wurde auf einem gehärteten Filter gesammelt, mit Wasser ausgewaschen und im Vakuum zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Der Niederschlag bestand aus bräunlich gefärbten, doppelbrechenden Körnern von annähernd gleicher Gröfse. Bei mikroskopischer Untersuchung erwiesen sie sich als aus radiär angeordneten Nadeln zusammengesetzt. Manche präsentierten sich als schön ausgebildete Rosetten, manche erschienen als kugelige Drusen, die ihre Zusammensetzung aus Nadeln nur an ihrer Peripherie, wo die Spitzen der Nadeln hervorragten, verrieten; bei manchen wiederum war die Struktur nur durch eine mehr oder minder deutliche radiäre Streifung angedeutet, oder aber es handelte sich um Sphäriten ohne deutlich wahrnehmbare Struktur.

Das Produkt erwies sich als leicht löslich in Methylalkohol, Aceton und Essigäther, schwer löslich in Äther und Petroläther; die gelbgefärbte Lösung in Alkohol oder Aceton wurde durch Wasserzusatz getrübt. Eine Probe der Substanz, mit alkoholischem Natriumäthylat vorsichtig erwärmt, gab sogleich eine dunkelrotbraune Lösung, die sich beim Ansäuern mit Salzsäure entfärbte. Eine Probe, mit einem Gemenge von konzentrierter Schwefelsäure und Eisessig erwärmt, gab nach Verdünnen mit Wasser und Entfernung der ungelösten Klumpen ein Filtrat, das auf Ammoniak-

zusatz eine schön rosenrote Färbung annahm und ammoniakalische Silberlösung beim Kochen kräftig reduzierte. Ferner wurde eine Probe mit konzentrierter Schwefelsäure übergossen, Wasser zugesetzt (wobei starke Erhitzung erfolgte), mit Natriumkarbonat übersättigt und filtriert; das schön rotgefärbte Filtrat gab mit Essigsäure angesäuert eine Olivenfärbung, die auf Alkalizusatz wieder in violettrot umschlug. Die Analyse ergab

C . . . . . 69,65 Proz.
H . . . . . 4,86 „
N . . . 2,01, 1,88 „

Zu einer Benzoylbestimmung reichte leider das Material nicht aus.

In allerjüngster Zeit gelangte ich in den Besitz eines von der Firma Parker, Davis & Co. unter dem Namen „Adrenalin“ in den Handel gebrachten, von einem Chemiker derselben, Dr. Jokichi Takamine, nach einem nicht bekannten Verfahren aus Nebennieren gewonnenen, blutdrucksteigernden krystallinischen Präparates, dessen Herstellung als ein sehr namhafter Fortschritt auf diesem Gebiete begrüfst werden darf.

Das Präparat bildet ein schwach gelblich gefärbtes Pulver, das sich bei mikroskopischer Betrachtung im wesentlichen als aus rundlich drusigen Aggregaten kurzer und ziemlich breiter Nadeln bestehend erweist. Die Substanz ist schwer löslich in kaltem Wasser, leicht löslich in verdünnten Säuren und freien Alkalien und zeigt in schöner Weise die dem Suprarenin eigentümlichen Farbenreaktionen und Reduktionserscheinungen. Nach Dr. Takamines Angaben, die ich der Ankündigung dieses Präparates seitens genannter Firma entnehme, vermag eine Menge von 8 Milliontel Gramm den Blutdruck eines 7 kg schweren Hundes um 14 mm zu erhöhen. Ich beobachtete bei einem Hunde von 4 kg, dafs eine Menge von 0,6 bis 1,2 Milliontel Gramm Adrenalin pro Kilo Körpergewicht den Blutdruck um 16 bis 18 mm, eine Menge von 2,5 Milliontel pro Kilo um 25 bis 34 mm, eine solche von 5 Milliontel um 50 mm, endlich eine solche von 20 Milliontel um 88 mm erhöhte. Die Wirksamkeit des Präparates wäre also, innerhalb der durch die Empfindlichkeit des Tierexperimentes naturgemäfs gegebenen Grenzen, derjenigen meiner Suprarenineisenpräparate gleich zu setzen.

Die Analyse eines solchen von der genannten Firma bezogenen, sodann 24 Stunden im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Präparates (0,35 g) ergab folgende Werte:

C . . .	57,84 Proz.
H . . .	7,16 „
N . . .	8,11 „
O . . .	26,89 „
	100,00 Proz.

Aus den gefundenen Werten berechnet sich das Verhältnis der Atome:

$$N : H : C = 1 : 12{,}3 : 8{,}3.$$

Die gefundene Relation nähert sich den aus den Analysen meiner Eisenpräparate gezogenen Mittelwerten

$$N : H : C = 1 : 11{,}3 : 7{,}7$$

und steht dem für das kohlenstoffreichste derselben berechneten Verhältnis

$$N : H : C = 1 : 12{,}2 : 8{,}5$$

so nahe, dafs, wie ja nach den Ergebnissen der Tierversuche von vornherein zu erwarten war, die Identität des Suprarenins mit dem Adrenalin kaum bezweifelt werden kann*). Der wesentlich gröfsere Sauerstoffreichtum der Suprarenineisenpräparate (N : O = 1 : 3,8 bis 4,9) dürfte im Eintritt von Sauerstoff in die Eisenverbindung seine Erklärung finden.

Berechnet man auf Grund der Zusammensetzung des besprochenen Präparates das von mir aus der Suprarenineisenverbindung hergestellte krystallinische Benzoylprodukt, so ergiebt sich, dafs es sich eventuell um ein Derivat handeln dürfte, das auf ein Stickstoffatom fünf Benzoylgruppen aufgenommen hat. Da die benutzte Art der Benzoylierung in ihrer Wirkungsweise noch nicht genauer untersucht ist, kann von einer weiteren Deutung des Befundes vorläufig abgesehen werden.

Von meinen älteren, aus unreinem Material gewonnenen Acetylprodukten lassen sich die kohlenstoffreicheren mit einer Acetylverbindung, die auf einen Stickstoff drei Acetyle enthält, in Einklang bringen.

Doch geht aus dem Gesagten einstweilen hervor, dafs das vorliegende analytische Material zur Aufstellung einer definitiven Formel für die quantitative Zusammensetzung des Suprarenins

*) Leider war es mir bisher nicht möglich, mir Material für Kontrollanalysen zu beschaffen. Auch darf angesichts des Umstandes, dafs die Darstellungsmethode des Präparates nicht bekannt ist, auch seine chemische Reinheit nicht über jedem Zweifel steht, den Analysenzahlen keine endgültige Bedeutung beigelegt werden.

noch nicht ausreicht. Auf den Versuch der Ableitung einer solchen kann für den Augenblick um so eher verzichtet werden, als weitere Analysen sicherlich in kurzer Zeit eine endgültige Entscheidung über die prozentische Zusammensetzung ermöglichen werden. Hoffentlich ergiebt sich dann auch die Möglichkeit, die Frage der Konstitution des Suprarenins ernstlicher in Angriff zu nehmen, als dies einstweilen geschehen konnte. Bisher gestatteten die Thatsachen nicht, über die Feststellung hinauszugehen, dafs es sich um eine mutmafslich hydrierte, zur Pyridinreihe in Beziehung stehende Substanz handelt, die an einem ringförmigen Kerne zwei Hydroxylgruppen in Orthostellung trägt.

Strafsburg, Juli 1901.

XV.

Über Glykoproteïde niederer Tiere.

Von Privatdozent Dr. **Otto von Fürth,**
Assistent am physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg und aus der zoologischen Station zu Neapel.

Gelegentlich eines Aufenthaltes an der zoologischen Station zu Neapel wandte ich dem Vorkommen zuckerabspaltender Eiweifskörper bei niederen Tieren einige Aufmerksamkeit zu. Da durch eine grofse Reihe von Untersuchungen aus den letzten Jahren bekanntlich sichergestellt worden ist, dafs Glykosamin durch Säurespaltung aus zahlreichen, dem Wirbeltierorganismus entstammenden Eiweifskörpern gewonnen werden kann, schien mir die Feststellung nicht ganz ohne Interesse zu sein, ob denn auch für Glykoproteïde, die den Lebensvorgängen niederer Tiere entstammen, Ähnliches gilt, oder ob man hier vielleicht wesentlich verschieden gearteten Verhältnissen begegnet. Dank dem freundlichen Entgegenkommen des Konservators der Station, Herrn Dr. Cavalliere Lo Bianco, ward es mir möglich, einiges Material zur Klärung dieser Frage zu sammeln.

1. Eihüllen der Sepien.

Die in Aussehen und Gröfse Sagokörnern ähnelnden Eier der Tintenfische sind von einer elastischen, meist schwarz gefärbten, rundlichen, an einem Pole zugespitzten, an dem anderen Pole zu einem Stiele verlängerten Hülle umgeben. Durch diesen Stiel werden die Eier in grofser Zahl zu traubigen Gebilden vereinigt, die man an unterseeische Gegenstände geheftet findet und die von den Fischern mit dem Namen „Seetrauben“ bezeichnet werden. Die Eihülle ist das erhärtete Sekret grofser Drüsen, der Nidamentaldrüsen, welche in der Nähe der Geschlechtsöffnung ausmünden und die Eier mit einer erstarrenden Kittsubstanz überziehen. Die dunkle Farbe verdanken die Eihüllen einer Beimengung

schwarzen Farbstoffs aus dem Tintenbeutel. Es gelingt im frischen Zustande leicht, die Eihülle von dem Ei abzutrennen, indem man die Spitze der ersteren abschneidet und durch leichten Druck das darin enthaltene Ei mitsamt den lockeren, es unmittelbar umgebenden Deckschichten herauspreſst. Die so isolierten Eihüllen wurden teils frisch untersucht, teils in Alkohol konserviert. Zum Zwecke weiterer Verarbeitung wurden sie getrocknet, fein gepulvert und mit kochendem Wasser, Alkohol und Äther erschöpft.

Die Eihüllen schlieſsen demnach im allgemeinen Körnchen von dunklem Sepienfarbstoff in groſser Menge ein, und da eine Trennung ohne weitgehende chemische Eingriffe nicht möglich ist, hätte ich darauf verzichten müssen, einen Einblick in die quantitative Zusammensetzung der intakten Kittsubstanz zu gewinnen, wenn nicht der Zufallsfund einer aus ganz farblosen Eiern zusammengesetzten Traube mir die Ausführung einer orientierenden Analyse gestattet hätte. Dieselbe ergab für die mit heiſsem Wasser, Alkohol und Äther erschöpfte und bei 105° zur Gewichtskonstanz getrocknete Substanz*):

C . . . . 49,70 Proz.
H . . . . 6,96 „
N . . . . 10,75 „

Die Zahlen liegen innerhalb der Breite der für Mukoidsubstanzen ermittelten Werte. Eine ähnliche Zusammensetzung fand z. B. Hammarsten**) für Pseudomucin aus Ovarialcysten (C 49,75, H 6,98, N 10,28), während das physiologisch analoge Mucin aus den Eihüllen des Frosches nach Giacosa***) sich etwas abweichend verhält (C 52,7 Proz., H 7,1 Proz., N 9,3 Proz.).

Nachdem Vorversuche den reichlichen Kohlehydratgehalt der in verdünnten Säuren und Alkalien in der Kälte kaum, in der Kochhitze anscheinend nur unter Zersetzung löslichen Substanz ergeben hatten, wurde die Menge des Kohlehydrats, welches durch andauerndes Kochen des Mukoids mit verdünnter Salzsäure abgespalten werden kann, durch Titration von Proben der filtrierten Zersetzungsflüssigkeit nach Fehling annähernd bestimmt.

So wurde gefunden:

Nach 1stündigem Kochen mit HCl von 4 Proz. abgespaltener Zucker, berechnet als Dextrose = 25 Proz. des Ausgangsmaterials,

*) Zu einer Schwefelbestimmung reichte das Material leider nicht aus.

**) Hammarsten, Lehrbuch der physiologischen Chemie, 3. Aufl., S. 366.

***) P. Giacosa: Études sur la composition chimique de l'œuf et de ses enveloppes chez la grenouille commune. Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 7. p. 40, 1882.

nach $1^1/_4$ stündigem Kochen mit HCl von 4 Proz. abgespaltener Zucker, berechnet als Dextrose = 33 Proz. des Ausgangsmaterials,
nach 2 stündigem Kochen mit HCl von 4 Proz. abgespaltener Zucker, berechnet als Dextrose = 30 Proz. des Ausgangsmaterials.

Berechnet man das abgespaltene Kohlehydrat anstatt als Dextrose als Glykosamin, entsprechend dem von Ledderhose*) berechneten Reduktionsvermögen des letzteren, so ergiebt sich für die Mukoidsubstanz der Eihüllen ein Kohlehydratgehalt von etwa 36 bis 39 Proz.

Zum Zwecke der Isolierung des Zuckers wurden 20 g der mit kochendem Wasser, Alkohol und Äther erschöpften, fein gepulverten Eihüllen vier Stunden lang mit 400 ccm Salzsäure von 4 Proz. gekocht, wobei nur ein Teil der Substanz in Lösung ging. Die filtrierte Zersetzungsflüssigkeit wurde mit einem Überschufs von neutralem Bleiacetat gefällt, das wasserhelle, farblose Filtrat mit einem Überschufs von Schwefelsäure versetzt, die vom schwefelsauren Blei befreite Flüssigkeit mit Natronlauge entsprechend alkalisch gemacht und mit reinstem Benzoylchlorid geschüttelt, wobei sich ein reichlicher, schwerer, körniger Niederschlag abschied, der sich bei Untersuchung im polarisierten Lichte als doppelbrechend erwies. Der abfiltrierte und mit Wasser gewaschene Niederschlag wurde in $^1/_4$ Liter kochenden absoluten Alkohols gelöst; beim Erkalten fiel nur ein sehr spärlicher amorpher Niederschlag aus. Es wurde nun das sechsfache Volumen Äther hinzugefügt, wobei sich eine reichliche Menge eines amorphen die Biuretreaktion gebenden Produktes von der Zusammensetzung C 53,78 Proz., H 5,82 Proz., N 8,78 Proz. abschied. Das Filtrat hinterliefs beim Eindunsten einen Syrup, der bei längerem Verweilen unter ammoniakhaltigem Wasser zu einer doppelbrechenden Masse erhärtete. Diese wurde in einem kleinen Volumen kochenden absoluten Alkohols gelöst. Die konzentrierte Lösung gab weder bei tagelangem Stehen im Eisschranke noch auf Zusatz des mehrfachen Volumens von Äther eine Abscheidung. Beim langsamen Eindunsten blieb ein Syrup zurück, der unter ammoniakhaltigem Wasser bald zu einer körnigen doppelbrechenden Masse erstarrte. Diese wurde auf ein gehärtetes Filter gebracht, sorgfältig mit Wasser ausgewaschen und im Vakuum über Schwefelsäure zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Das so erhaltene schneeweifse Pulver erwies sich als leicht

*) Ledderhose, Zeitschrift für physiol. Chemie 4, 147.

löslich in Alkohol, Aceton, Chloroform, Essigäther und Eisessig; von Benzol wurde es in der Kälte schwer, beim Kochen leicht gelöst und schied sich beim Erkalten der Lösung syrupös ab; Äther löste auch in der Wärme nur schwer. Die Lösung in Chloroform wurde durch Petroläther gefällt. Zahlreiche Versuche, mit Hülfe eines dieser Lösungsmittel und mit Kombinationen derselben das Produkt in die Form ausgebildeter Krystalle überzuführen, blieben ohne Erfolg.

Einige Körnchen des Pulvers gaben eine prachtvolle Reaktion nach Molisch und reduzierten Fehlingsche Lösung beim Kochen in Gegenwart von viel Alkali.

Die Analyse ergab:

	I.	II.	Für Glykosamintribenzoat berechnet sich:
C	66,25 Proz.	66,03 Proz.	65,99 Proz.
H	5,42 „	5,43 „	5,09 „
N	2,55 „	2,61 „	2,85 „
O	25,78 „	25,93 „	26,07 „
	100,00 Proz.	100,00 Proz.	100,00 Proz.

Bei einem anderen Versuche ging ich derart vor, dafs ich die Salzsäurezersetzungsflüssigkeit direkt mit einem Überschufs von Phosphorwolframsäure fällte, um Peptone uud dergl. von vornherein zu beseitigen. Das wasserhelle farblose Filtrat wurde durch einen Zusatz von krystallisiertem Eieralbumin von Phosphorwolframsäure, dann durch genaue Neutralisation von Eiweifs befreit und die Flüssigkeit, die sich nunmehr weder als durch Eiweifslösung noch durch Phosphorwolframsäure fällbar erwies, nach Schotten-Baumann benzoyliert. Das zähe Reaktionsprodukt erhärtete unter verdünntem Ammoniak zu einer körnig-krystallinischen Masse, die nach sorgfältigem Auswaschen und Trocknen im Vakuum über Schwefelsäure die Zusammensetzung aufwies:

		Ein Glykosaminpentabenzoat verlangt:
C . . .	70,46 Proz.	70,38 Proz.
H . . .	5,34 „	4,72 „
N . . .	1,85 „	2,00 „

Eine Reihe von Versuchen, das Benzoylprodukt durch Natriumäthylat, durch Erhitzen mit verdünnter Schwefelsäure auf 150 bis 160°, durch Erwärmen mit einem Gemenge von Eisessig und konzentrierter Salzsäure u. s. w. zu verseifen, führte zu reduzierenden Lösungen, aus denen jedoch kein krystallinisches Produkt abgeschieden werden konnte.

Aus einer wie oben durch Bleiacetatfällung gereinigten farblosen Zersetzungsflüssigkeit konnte ein Osazon dargestellt werden, das, aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert, in Rosetten ausfiel, die sich als aus kurzen breiten Nadeln (Schwerterformen) zusammengesetzt erwiesen; bei weiterem Umkrystallisieren mit Hülfe von Pyridin nach Neubergs Angaben wurde es in Form feiner Nädelchen erhalten. Die Ausbeute an Osazon war eine sehr geringe und stand mit dem Reduktionsvermögen in auffälligem Widerspruche, wie ich mich durch Darstellung von Osazonen aus Dextrose- und Galaktoselösungen von gleichem Reduktionsvermögen in augenfälliger Weise überzeugen konnte.

Eine ebensolche Zersetzungsflüssigkeit erwies sich als stark rechtsdrehend. Das Kohlehydrat konnte durch ammoniakalisches Bleiacetat gefällt werden, doch gelang es nicht, den aus dem Niederschlage durch Schwefelwasserstoff frei gemachten Zucker zur Krystallisation zu bringen.

Mit Rücksicht auf die Befunde von Schulz und Ditthorn*), die durch Spaltung eines Glykoproteïds aus der Eiweifsdrüse des Frosches Galaktosamin erhalten hatten, versuchte ich, ob nicht vielleicht auch aus dem Kohlehydrat der Eihüllen von Sepien durch Salpetersäurespaltung Schleimsäure gewonnen werden könne. Zu diesem Behufe wurde eine nach dem Phosphorwolframsäureverfahren erhaltene farblose Zersetzungsflüssigkeit im Vakuum über Schwefelsäure eingedunstet, der syrupöse Rückstand mit Methylalkohol extrahiert und die Lösung mit methylalkoholischem Barythydrat gefällt; dabei wurde der Zucker als Barytverbindung anscheinend vollständig niedergeschlagen. Der mit Methylalkohol und Äther ausgewaschene, im Vakuum getrocknete Niederschlag bildete ein lichtgelbes, in Wasser leicht lösliches Pulver. Die wässerige Lösung, die durch Kohlensäure nicht getrübt wurde, reduzierte Fehlingsche Lösung aufserordentlich kräftig. Ein Osazon konnte daraus weder direkt, noch nach Zersetzung mit Schwefelsäure erhalten werden. Einige Gramm dieser Barytverbindung wurden mit Salpetersäure (spez. Gew. 1,15) erst kurze Zeit im Wasserbade, dann bei etwa 60° bis zur Beendigung der Gasentwickelung erhitzt. Aus der Flüssigkeit konnte jedoch auch nach Neutralisation weder Schleimsäure noch sonst eine schwerlösliche organische Substanz zur Abscheidung gebracht werden. Ebenso wenig ergab direkte Zersetzung der Eihüllen mit Salpetersäure ein positives Resultat.

Ich hatte, wie ich anschliefsend bemerken will, auch Gelegenheit, die Eihüllen von Loligo (Calmar) von den gleichen Gesichtspunkten aus zu untersuchen. Die Loligoeier sind stecknadelkopf-

*) Fr. N. Schulz und F. Ditthorn: Galaktosamin, ein neuer Amidozucker, als Spaltungsprodukt des Glykoproteïds der Eiweifsdrüse des Frosches. Zeitschrift für physiol. Chemie 29, 373, 1900.

grofs und finden sich in grofser Zahl in einer gallertigen cylindrischen Hülle eingeschlossen. Nach Koagulation in kochendem Wasser gelingt es, wenn auch mit einiger Mühe, die Hülle von den Eiern mechanisch abzutrennen und man kann sich durch Säurespaltung ohne weiteres von dem grofsen Zuckergehalt dieses Glykoproteïds überzeugen.

2. Grundsubstanz der Chondrosia.

Ich wandte ferner meine Aufmerksamkeit einer Spongie und zwar der zu den Gallertschwämmen zählenden Chondrosia reniformis zu, da Krukenberg*) die Grundsubstanz dieses Schwammes als ein kohlehydratreiches „Hyalogen“ bezeichnet. Nach Pepsinverdauung und Erschöpfung der Chondrosiascheiben mit kochendem Wasser, Alkohol und Äther behauptet er, derselben durch Natronlauge von 5 Proz. ein nach Neutralisation mit Alkohol fällbares „Hyalin“ entzogen zu haben, aus dem nach Zerkochen mit verdünnter Schwefelsäure „reichliche Mengen eines gut krystallisierenden Zuckers erhalten wurden, der, frisch dargestellt, mit Hefe nicht gärte, sich aber nach 12 Monate langer Aufbewahrung durch Hefe leicht in Gärung versetzen liefs“.

Quantitative Versuche ergaben, dafs die Annahme Krukenbergs, es handle sich hier um einen besonders zuckerreichen Eiweifskörper, eine durchaus willkürliche war.

Die Chondrosiaknollen wurden zu feinen Scheiben zerschnitten, mit Wasser ausgekocht, getrocknet, staubfein gepulvert, sodann das Pulver erst lange Zeit mit oft gewechseltem kochenden Wasser, dann mit Alkohol und Äther erschöpft.

Beim Zerkochen des so erhaltenen Pulvers mit verdünnter Salzsäure konnte ich mich leicht davon überzeugen, dafs die Titration nach Fehling oder Knapp in einer Flüssigkeit, die relativ wenig Zucker neben viel Eiweifszerfallsprodukten enthält, allzu unsichere Werte liefert. Ich ging daher so vor, dafs ich die saure Zersetzungsflüssigkeit direkt mit Phosphorwolframsäure fällte, den voluminösen Niederschlag auf einem Saugfilter mit verdünnter Phosphorwolframsäure gründlich auswusch und das Filtrat, mit den Waschwässern vereinigt, unter Vermeidung von Verlusten, wie oben angegeben, weiter behandelte. Nach diesem Verfahren,

*) C. Fr. W. Krukenberg, Weitere Mitteilungen über die Hyalogene. Zeitschrift für Biologie 22, 267, 1886.

dem eine allgemeinere Verwendbarkeit für ähnliche Fälle zukommen dürfte [vergl. Langstein*)], fand ich die Menge des aus der Grundsubstanz der Chondrosia durch Salzsäure von 4 Proz. abspaltbaren Zuckers nur entsprechend 5,6 Proz. des Ausgangsmaterials, wobei Titration nach Fehling und nach Knapp mir völlig übereinstimmende Werte lieferten.

Die Darstellung eines Benzoylproduktes aus dem Phosphorwolframsäurefiltrat erfolgte nach dem beim Sepienzucker eingehaltenen Verfahren. Das erhaltene körnige doppelbrechende Benzoylprodukt stimmte mit dem analogen Produkte aus den Eihüllen so sehr überein, dafs eine genaue Beschreibung überflüssig wäre. Die Analyse desselben ergab:

C	67,98 Proz.
H	4,81 „
N	1,84 „

Ein Glycosamintetrabenzoat würde erfordern:

C 68,57 Proz., H 4,87 Proz., N 2,35 Proz.

Wenngleich die Lösungsverhältnisse meiner Benzoylprodukte in mancher Hinsicht von aus reinem Glykosamin dargestellten abweichen und eine scharfe Identifizierung angesichts der Unmöglichkeit einer krystallographischen Charakteristik nicht durchführbar erscheint, wird man schwerlich fehlgehen, wenn man annimmt, dafs die untersuchten Glykoproteïde niederer Tiere sich hinsichtlich ihres Zuckerpaarlings im grofsen und ganzen so verhalten wie diejenigen höherer Tiere, und dafs hier wie dort amidierte Zucker vom Typus des Glykosamins als deren charakteristische Spaltungsprodukte anzusehen sind.

Strafsburg, Juli 1901.

---

*) Langstein, Die gerinnbaren Stoffe des Eierklars. Diese Zeitschrift 1, Heft 3 und 4, 1901.

XVI.

Die Kohlehydrate des krystallisierten Serumalbumins.

Von Dr. **Leo Langstein** aus Wien.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

1.

Untersuchungen über das Vorhandensein einer Zuckergruppe in den Proteiden des Blutserums liegen, obwohl sie sowohl für die Konstitution dieser Eiweifskörper, als auch für den Kohlehydratstoffwechsel im Organismus von grofsem Interesse wären, nur in geringem Ausmafs vor. Für das Globulin des Blutes, das allerdings ein Gemenge mehrerer Eiweifskörper darstellt, ist wenigstens die „glykosidische" Natur sichergestellt, da es fast allen Untersuchern gelang, daraus nach Spaltung mit verdünnter Säure ein typisches Osazon zu erhalten. Hingegen lauten die spärlichen Angaben über einen aus Serumalbumin abspaltbaren Zucker recht widersprechend.

Pavys*) Untersuchungen kommen für die hier zu erörternde Frage nicht weiter in Betracht, da er nicht das isolierte Serumalbumin, sondern das Gemenge der Proteide des Blutserums untersucht hat.

K. A. H. Mörner**), dem es gelungen war, unter den Spaltungsprodukten der Globuline des menschlichen Blutserums ein Kohlehydrat nachzuweisen, vermifste ein solches im Serumalbumin.

Diesem Befunde gegenüber steht das positive Resultat Krawkows***), der aus Serumalbumin vom Rinderblut einen redu-

*) Pavy, Die Physiologie der Kohlehydrate, 1895.

**) K. A. H. Mörner, Centralbl. f. Physiologie 1894, 19, 20.

***) Krawkow, Pflügers Archiv 65, 897.

zierenden und osazongebenden Körper abspalten konnte, dessen Menge er allerdings als eine sehr geringe bezeichnet.

Eichholz*) hinwiederum kam bei seinen Untersuchungen über eine Zuckergruppe im Serumalbumin zu einem vollständig negativen Ergebnis. Mit Rücksicht darauf, dafs es ihm gelungen war, aus anderen untersuchten Eiweifskörpern ein durch das Osazon charakterisiertes Kohlehydrat abzuspalten, sagt er vom Serumalbumin: „It stands apart from them as a representative of the true proteids."

Es sei mir gestattet, mit wenigen Worten auf die Versuchsmethodik von Eichholz einzugehen, da ich zwecks einer Erklärung der sich widersprechenden Befunde bei meinen Untersuchungen auf diese werde zurückkommen müssen.

In einer Versuchsreihe verwendete Eichholz nach der Methode von Johansson**) hergestelltes Serumalbumin (Abtrennung von Globulin durch Sättigung mit Magnesiumsulfat, dann Zusatz von 0,5 bis 1 Proz. Essigsäure). Nach Spaltung mit verdünnter Schwefelsäure konnte er jedoch in der Zersetzungsflüssigkeit weder Reduktion noch eine osazongebende Substanz nachweisen. Ebenso wenig gelang ihm dies mit nach der Methode von Starke***) (Ausfällung des Globulins mit Magnesiumsulfat bei $+ 20^0$ und Sättigung des Filtrates mit Natriumsulfat bei derselben Temperatur) hergestelltem Serumalbumin. Einer zweiten Serie von Versuchen legte er die Methodik von Pavy zu Grunde: Serumalbumin, 13 g, wurde in 100 ccm 20prozentiger Kalilauge durch drei Stunden auf dem Wasserbade digeriert, die Flüssigkeit nach Verdünnung auf das Doppelte eine halbe Stunde lang gekocht, mit Essigsäure neutralisiert, filtriert, durch Eindampfen konzentriert und in Alkohol gegossen. Die wässerige Lösung des dabei ausfallenden Niederschlages, zwei Stunden lang mit 10proz. Schwefelsäure gekocht, mit Baryt neutralisiert und eingeengt, wurde auf Reduktion beziehungsweise Osazon geprüft. Auch dieser Versuch blieb ohne positives Ergebnis.

Eichholz bezieht den positiven Befund Krawkows auf mangelhafte Ausfällung der Globuline, die bei Sättigung mit Magnesiumsulfat in der Kälte keine vollständige sei.

2. Methodisches.

Für meine nachstehend mitzuteilenden Versuche benutzte ich grofse Mengen krystallisierten Serumalbumins (im ganzen ungefähr 1 kg aus etwa 120 Litern Pferdeblutserum). In solch

*) Eichholz, Journal of Physiology, 1898—1899.
**) Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 317.
***) Starke, Malys Jahresber. 11, 17.

grofsem Ausmafs zu arbeiten, erschien notwendig; denn da der positive Ausfall der Furfurolreaktionen im Serumalbumin für das Vorhandensein eines Kohlehydratkomplexes sprach, schien es von vornherein nicht unwahrscheinlich, dafs die geringen Mengen Ausgangsmaterial, die von einzelnen Forschern verwendet wurden, an den von ihnen erzielten negativen Ergebnissen schuld trugen. Andererseits ist es eine berechtigte Forderung behufs Erlangung eindeutiger Ergebnisse, von krystallisiertem Material auszugehen, zumal sonst bei der Reichhaltigkeit des Blutes an anderen kohlehydratliefernden Stoffen für deren Beseitigung keine Gewähr vorhanden ist. Bei dem leicht zu beschaffenden Ausgangsmaterial und der relativ guten Ausbeute an krystallisiertem Serumalbumin — ich erhielt durchschnittlich 8 bis 10 g aus einem Liter Blut nach dreimaligem Umkrystallisieren — ist die Darstellung krystallisierten Materials kaum unökonomischer oder zeitraubender, als wenn man nach Versetzen des Blutserums mit dem gleichen Volumen Ammonsulfatlösung (zur Entfernung der Globuline) reines Serumalbumin durch Koagulation und tagelanges Auswaschen (zur Befreiung von anhaftender Schwefelsäure) gewänne. Zudem besteht ein weiterer Vorteil des krystallisierten Serumalbumins darin, dafs man es als fast rein weifses Pulver erhält, während nach anderer Methode hergestellte, amorphe Präparate sich beim Eintrocknen ganz schwarz färben, ein Umstand, der dem störenden Auftreten von „Melaninen" bezw. Huminsubstanzen bei der Säurespaltung Vorschub leistet. Bei der Krystallisation folgte ich der durch Gürber und Pemsel*) gegebenen Methodik, krystallisierte dreimal um, löste schliefslich in möglichst wenig Wasser, dialysierte einige Tage, koagulierte durch Eingiefsen in heifsen Alkohol, wusch bis zum fast vollständigen Verschwinden der Schwefelsäurereaktion mit destilliertem Wasser, schliefslich mehrmals mit Alkohol und Äther, und trocknete bei 110°.

Der leitende Gesichtspunkt bei meiner Untersuchung war der, das Verhalten der Furfurolreaktion (nach Molisch) bei der Zersetzung des krystallisierten Serumalbumins in ihrer Intensität (kolorimetrisch) zu verfolgen, den diese Reaktion gebenden Körper in eine kleine Fraktion zu konzentrieren und ihn aus dieser durch ein geeignetes Verfahren zu isolieren.

Für Vorversuche verwandte ich je 25 g feingepulvertes, krystallisiertes Serumalbumin. Zuerst versuchte ich Säurespaltung

*) Inauguraldiss. H. Th. Krieger, 1899.

(Kochen mit 3-, 10-, 20proz. Salzsäure und Schwefelsäure mit und ohne vorhergehende Quellung in Alkali).

Dabei löste sich in kürzerer oder längerer Zeit, je nach der Konzentration der verwendeten Säure, das Serumalbumin zu einer gelb gefärbten Flüssigkeit (die stärker konzentrierten Säuren verbieten sich bei der Spaltung wegen der störenden Melaninbildung), die eine schöne Reaktion mit α-Naphtol und Schwefelsäure, minimale Reduktion und keine Pentosenreaktion giebt. Die Furfurolreaktion ist (beim Spalten mit 3proz. Salzsäure) ungefähr nach einer Stunde maximal, klingt dann ab und ist nach drei Stunden vollständig verschwunden. Versucht man zur Zeit der maximalen Furfurolreaktion, nach dem Vorgange von Friedrich Müller*) und Seemann**) bei ihren Spaltungsversuchen am Mucin, Mukoid und Ovalbumin, das Benzoylprodukt eines Kohlehydrates zu erhalten, so ist das Ergebnis ein negatives. Versetzt man zu dem Zweck, um sich zu überzeugen, ob die Flüssigkeit ein abgespaltenes Kohlehydrat enthält, eine Probe derselben mit Phosphorwolframsäure, so gehen nur geringe Spuren des furfurolliefernden Körpers in das Filtrat, während die Hauptmasse im Niederschlage zu suchen ist. Es läfst sich dieser Befund in dem Sinne deuten, dafs durch die Säurespaltung wohl die Bildung eines zuckerabspaltenden Komplexes, einer Glykoalbumose oder eines Glykopeptons erreicht, das Kohlehydrat selbst aber nur in minimalen Mengen abgespalten wird, während durch längeres Kochen mit Säure der Kohlehydratkomplex vollständig zerstört oder wegen Anwesenheit anderer freiwerdender Zersetzungsprodukte in nicht faſsbare Substanzen übergeführt wird. Hierdurch erscheint zugleich eine Deutung für Krawkows und Eichholz' sich widersprechende Resultate ermöglicht.

Da demnach die Methode der Säurespaltung allein eine befriedigende Lösung der Frage nach dem Zuckermolekül im Serumalbumin nicht versprach, kombinierte ich sie mit vorhergehender Einwirkung von Alkali, ähnlich wie es Pavy in seinen Versuchen angiebt.

Digeriert man, wie Eichholz, drei Stunden auf dem Wasserbade mit 20proz. Alkali und fällt nach Ansäuern und Eindampfen mit Alkohol, so erhält man bei Verwendung von 25 g Serumalbumin eine geringe Menge Niederschlag, der neben sämtlichen Eiweifsreaktionen eine schöne Rotfärbung mit α-Naphtol und Schwefelsäure giebt. Die Menge dieses Niederschlages beträgt nach der Trocknung kaum ein halbes Gramm, beim Reinigen durch Lösen und Fällen erhält man noch geringere Mengen. Auch die alkoholische Lösung enthält noch reichlich den Kohlehydratkomplex. Bei der geringen Menge Substanz, von der Eichholz ausging, vermögen bereits diese Umstände allein sein negatives Ergebnis zu erklären.

*) Friedrich Müller, Sitzungsber. z. Bef. d. ges. Naturw., Marburg 1896.

**) J. Seemann, Inauguraldiss., Marburg 1898.

Da ich bei einem Versuche zufällig die Beobachtung machte, dafs bei längerer Kalispaltung mehr furfurolliefernde Substanz als Niederschlag auftritt, versuchte ich nun, die Ausbeute an diesem Körper durch eingreifendere Alkalibehandlung von gröfseren Mengen Ausgangsmaterial zu steigern. Nach Anstellung zahlreicher Vorversuche erwies sich die im Folgenden mitzuteilende Methodik als die beste.

50 g Serumalbumin, mit ganz wenig Wasser zu einem dicken Brei angerührt, werden mit 40 g festen gepulverten Kalis so lange auf dem Wasserbade bei einer Temperatur von 80 bis 90° digeriert, bis sich eine durchsichtige, leicht gelblich gefärbte Gallerte bildet; dann wird Wasser (200 ccm) dazugefügt und zwei bis drei Tage unter Erhaltung des gleichen Volumens auf dem Wasserbade stehen gelassen. Schliefslich wird die Lösung bis zu einem Gehalt von 10 Proz. Alkali verdünnt und zwei bis drei Stunden am Rückflufskühler gekocht, nach dem Erkalten mit Essigsäure schwach angesäuert, vom schwärzlichen, reichlich sich abscheidenden, massenhaft Schwefel enthaltenden Niederschlag abfiltriert, und die klare, leicht gelb gefärbte Lösung zum dicken Sirup eingedampft; dieser wird mit ungefähr 2 Vol. Alkohol angerührt, so dafs ein ausfallender Niederschlag sich nicht mehr löst, und diese alkoholische Flüssigkeit in so viel Alkohol gegossen, dafs der Gehalt an diesem in der Lösung mindestens 85 Proz. beträgt. Der sich dabei bildende Niederschlag bleibt zunächst suspendiert, setzt sich jedoch beim Stehen am kühlen Orte als gelbbrauner Sirup ab, von dem die darüberstehende gelbgefärbte alkoholische Lösung abgegossen werden kann. Dieser gelbbraune Sirup, der leicht in Wasser löslich ist, giebt auffallend starke Furfurolreaktionen, ohne jedoch alkalische Kupferlösung zu reduzieren, während die darüberstehende alkoholische Lösung, nach dem Destillieren des Alkohols möglichst konzentriert, die Furfurolreaktionen vermissen läfst. Die Menge des aus 50 g erhältlichen Sirups, bestimmt am Trockengewicht eines kleinen Teiles, beträgt ungefähr $1^1/_2$ g. Doch enthält er noch reichlich Asche. Reinigt man den Sirup durch wiederholtes Lösen in Alkali und Fällen mit Alkohol noch so oft, so ist er doch niemals von der Biuretreaktion und anderen Eiweifsreaktionen frei zu erhalten.

Auch durch das Alkali-Kupferverfahren von Schmiedeberg*) konnte ich kein von Biuretreaktion freies Kohlehydrat isolieren.

*) Schmiedeberg, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 28, 354.

Ebenso wenig führte das von S. Fränkel*) anläfslich seiner Arbeit über die Kohlehydratgruppe im Eiweifs ausgearbeitete Verfahren zu einem biuretfreien Präparat, wobei noch bemerkt sei, dafs sich das Serumalbumin der Spaltung durch Baryt gegenüber als sehr resistent erweist.

Ich erwähne diese Thatsache mit Rücksicht auf das viel diskutierte tierische Gummi Landwehrs**), zu dem ich durch das angewandte Verfahren eigentlich hätte gelangen müssen, wenn im Serumalbumin ein solches präformiert wäre. Nach meinen Erfahrungen scheint demnach die Isolierung eines tierischen Gummis aus dem Serumalbumin unmöglich zu sein; es dürfte vielmehr bei der Alkalispaltung eine Glykoalbumose resp. ein Glykopepton im Sinne von E. P. Pick***) resultieren; denn auch durch Benzoylierung des Sirups, wobei etwa vorhandenes Dextrin leicht reagieren müfste, erhielt ich kein aus alkalischer Lösung ausfallendes Benzoylprodukt.

Aus dem im Wasser gelösten Sirup versuchte ich den Zucker durch Spaltung mit Säure zu isolieren. Dabei bewährte sich am besten 5proz. Schwefelsäure. Nach zwei bis drei Stunden langem Kochen mit derselben am Rückflufskühler erhielt ich deutliche Reduktion von Fehlingscher Lösung und mit Phenylhydrazin und Essigsäure ein typisches Osazon vom Aussehen des Glukosazons mit einem Schmelzpunkt, der zwischen 196 und 200° lag. (Krystallisation aus Pyridin.) Durch Titration in der noch immer Eiweifskörper enthaltenden Flüssigkeit nach Fehling erhielt ich Werte, die, auf Serumalbumin berechnet, einem Gehalte desselben von 1 bis $1^1/_4$ Proz. Zucker entsprachen. Wenn ich jedoch nach v. Fürth†) aus der schwefelsauren Lösung die Eiweifskörper mit Phosphorwolframsäure ausfällte und im enteiweifsten wasserklaren Filtrate, nach Entfernung des Überschusses an Phosphorwolframsäure durch krystallisiertes Ovalbumin, die Menge des abgespaltenen Zuckers nach Knapp und Fehling bestimmte, erhielt ich Werte, die, auf Serumalbumin berechnet, nur ungefähr einen Gehalt von $^1/_2$ Proz., auf Glukose berechnet, anzeigten. Dafs die titrimetrische Bestimmung von Zucker in eiweifshaltigen Flüssigkeiten nach Fehling stets, wie auch hier, zu hohe Werte liefert, darauf hat schon Salkowski††) seiner Zeit aufmerksam gemacht.

*) S. Fränkel, Sitzungsber. d. kais. Akad. d. Naturw., Bd. CVII. Abtl. IIb.

**) Landwehr, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. VIII u. IX.

***) E. P. Pick, Daselbst Bd. XXIV u. XXVIII.

†) Vergl. Langstein, Über die gerinnbaren Stoffe des Eierklars, diese Zeitschr., H. 3 u. 4.

††) Salkowski, Centralbl. f. d. mediz. Wiss. 1893, S. 707.

3. Nachweis von Glukosamin.

Da es mit Rücksicht auf die Untersuchungen Seemanns und meine eigenen*), durch welche das aus Eieralbumin abspaltbare Kohlehydrat als Amidohexose charakterisiert ist, von prinzipiellem Interesse schien, zu untersuchen, ob dieser Zucker, der ja dasselbe Osazon giebt wie Glukose**), auch im Serumalbumin präformiert sei, wurde trotz der geringen Ausbeute versucht, den abgespaltenen Zucker selbst durch sein Benzoat zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurden 500 g Serumalbumin in Portionen von je 100 g nach der obenstehenden Methode verarbeitet, die den Zucker enthaltenden eiweifsfreien Flüssigkeiten schliefslich nach Baumann benzoyliert. Dabei erhielt ich dreimal nach Umkrystallisieren aus heifsem Alkohol ein doppeltbrechendes mikrokrystallinisches Benzoylprodukt, ein einziges Mal schöne lange weifse Nadeln.

Die Analyse des mikrokrystallinischen Präparates ergab folgende Werte:

0,183 g enthielten 69,984 Proz. C und 4,79 Proz. H.
0,134 „ „ 2,14 „ N.

Dies sind Zahlen, die einem Gemenge von wenig Tetrabenzoylglykosamin mit überwiegendem Pentabenzoylglykosamin entsprechen.

Es berechnet sich für:

	Glukosamin-tetrabenzoat	Glukosamin-pentabenzoat
C	68,75 Proz.	70,38 Proz.
H	4,83 „	4,72 „
N	2,22 „	2,00 „

Das in langen Nadeln krystallisierende Produkt zeigte einen Schmelzpunkt von 201 bis 204°, entsprechend dem Pentabenzoat. Mein Material reichte leider nur zu einer N-Bestimmung aus.

0,083 Subst. gaben 2,03 Proz. N; für Glukosaminpentabenzoat berechnet sich 2,00 Proz.

Nach diesem Befunde kann kein Zweifel bestehen, dafs das Glukosamin am Aufbau des Serumalbumins beteiligt ist, wenn ich mir es auch leider versagen mufste, bei der geringen Ausbeute an Benzoylprodukt und dem kostbaren Ausgangsmaterial den Zucker selbst darzustellen. Mit Rücksicht darauf, dafs bis zu vorliegender Untersuchung nur aus solchen Eiweifsstoffen Glukos-

*) Langstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 49.
**) Neuberg, Zeitschr. f. klin. Medizin 42, H. 5 u. 6.

amin gewonnen wurde, die ein typisches Sekretionsprodukt darstellen, ist der Befund des Glukosamins unter den Spaltungsprodukten des Serumalbumins von prinzipieller Bedeutung*).

Es sei jedoch nicht verschwiegen, dafs es mir bei Verarbeitung einer Portion von 100 g Serumalbumin nicht gelang, ein bei alkalischer Lösung ausfallendes Benzoylprodukt zu erhalten. Es läfst sich dieser vereinzelt negative Befund vielleicht mit einer zufällig zu tief greifenden Alkalispaltung erklären, während das negative Ergebnis der Versuche von Eichholz — ganz abgesehen von der geringen Menge des von ihm verwandten Ausgangsmaterials — wohl in zu wenig eingreifender Behandlung mit Alkali seine Erklärung findet. Die bisher vorliegenden Untersuchungen über die Zuckergruppe im Eiweifs erlauben ja bereits ein Urteil in dieser Richtung. Denn während aus den Mucinen und Mukoidstoffen sich bereits durch einfache Säurewirkung die maximale Kohlehydratmenge abspalten läfst, das Ovalbumin und Conalbumin, um zu einer möglichst guten Ausbeute an Kohlehydrat durch Säurespaltung zu gelangen, einer vorhergehenden starken Quellung in Alkali bedürfen, ist für das Serumalbumin eine noch viel tiefer greifende Alkalibehandlung notwendig. Damit ist aber auch die Schwierigkeit gegeben, das Alkali so stark einwirken zu lassen, dafs die Kohlehydratgruppe durch Säure abspaltbar wird, und sie doch nicht zu zerstören. Daher berechtigen die kleinen Ausbeuten an Glukosamin, die ich hier erhalten habe, nicht zu dem Schlusse, dafs nur so geringe Mengen Glukosamin im Serumalbumin präformiert sind, sondern sie stellen Minimalzahlen dar, insofern eben nur das bei dem eingreifenden Alkaliverfahren nicht zerstörte Glukosamin nach der Säurespaltung nachgewiesen werden kann.

4. Die zweite Kohlehydratkomponente im Serumalbumin.

Da mir der intensive Ausfall der Furfurolreaktionen im durch die Kali-Alkoholbehandlung gewonnenen Sirup mit der geringen reduzierenden Kraft nach der Spaltung mit Säure im auffallenden Widerspruch zu stehen schien, versuchte ich, ob sich nicht die Existenz eines zweiten, die Furfurolreaktion gebenden, Feh-

*) Vergl. Friedr. Müller, Verhandl. d. Naturforscherges. in Basel 12, H. 2, S. 256; vergl. Zängerle, Münch. medizin. Wochenschr. 13, 1900.

lingsche Lösung nicht reduzierenden Körpers im Serumalbumin erweisen läfst.

Ich möchte von den Ergebnissen der angestellten Versuche, mit deren Weiterführung ich beschäftigt bin, hier nur vorläufig Mitteilung machen.

Spaltet man den durch Kali-Alkoholbehandlung gewonnenen, in Wasser gelösten Sirup anstatt mit Schwefelsäure mit Salzsäure, die jedoch, wie ich mich durch zahlreiche Versuche überzeugen konnte, von sehr niedriger Konzentration, am besten $^1/_2$- bis 1proz. gewählt werden mufs, und prüft in kurzen Pausen Proben der Zersetzungsflüssigkeit nach Fällung mit Phosphorwolframsäure, so geht nach ungefähr einer halben Stunde ein furfurolliefernder Körper in das Filtrat der Phosphorwolframate über. Spaltet man länger, so nimmt die Reaktion mit α-Naphtol und Schwefelsäure in den Filtraten an Intensität immer mehr ab und verschwindet schliefslich vollständig. (Die Phosphorwolframate geben bei Anwendung so schwacher Säure immer noch starke Furfurolreaktionen.) Bei Spaltung mit konzentrierter Salzsäure lassen sich diese Phasen nicht deutlich verfolgen.

Dieser Befund läfst vorläufig keine andere Deutung zu, als dafs durch verdünnte Salzsäure ein furfurolgebender Körper abgespalten wird, der durch längeres Kochen mit Säure wieder zerstört wird. Bei dieser wenig intensiven Säurewirkung wird das Glykosamin wohl gar nicht oder nur höchst unvollständig abgespalten.

Für vorläufige Versuche zu einer Charakterisierung dieses Körpers benutzte ich 180 g Serumalbumin. Der daraus durch Kali-Alkoholbehandlung gewonnene Sirup wurde in wenig Wasser gelöst und mit $^1/_2$proz. Salzsäure eine halbe Stunde lang gekocht. Hierauf wurden die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen ausgefällt, die überschüssige Phosphorwolframsäure durch eine Lösung von krystallisiertem Ovalbumin, das dabei in Lösung gehende Eiweifs durch Hitzekoagulation beseitigt. Die erhaltene wasserklare Lösung giebt eine intensive Violettfärbung mit α-Naphtol und Schwefelsäure, keine Reaktion mit Phloroglucin und Salzsäure, reduziert Fehlingsche Lösung weder vor noch nach neuerlicher Säurespaltung. (Der Furfurolkörper ist, wenn isoliert, gegen Säurebehandlung ziemlich resistent.) Auffallenderweise reduziert die Lösung jedoch ammoniakalische Silberlösung.

War durch dieses Verhalten bereits der Gedanke an das Vorliegen einer Kohlehydratsäure gegeben, so gewann er durch die Möglichkeit, Salze dieses Körpers herzustellen, an Wahrscheinlichkeit.

Entfernt man nämlich nach der Beseitigung der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen den Überschufs des Reagens durch Barytwasser, so geht der furfurolliefernde Körper, der jede Pentosenreaktion vermissen läfst, in den Niederschlag von phosphorwolframsaurem Baryt mit ein und läfst sich aus diesem hinterher durch heifses Wasser nur zum kleinen Teil ausziehen. Es erinnert dieses eben geschilderte Verhalten einigermafsen an jenes der Zucker- oder Gulonsäure, doch bestätigte eine an einer geringen Menge Substanz vorgenommene Baryumbestimmung diese Vermutung nicht. Es gelang mir vorläufig nicht, durch eine geeignete Methodik den Körper in ausreichender Menge und analysenfähiger Form zu erhalten. Die Benzoylierung ergiebt nur ein äufserst spärliches, bei alkalischer Reaktion in kleinsten Tröpfchen ausfallendes Benzoylprodukt.

Ich hoffe, bei Veröffentlichung der mich gegenwärtig beschäftigenden Untersuchungen über die Kohlehydratgruppen in den anderen Proteiden des Blutes über die Natur dieser Kohlehydratsäure Mitteilung machen zu können, da ich inzwischen gröfsere Mengen Ausgangsmaterial hergestellt habe. Es wird sich dabei auch die Gelegenheit ergeben, auf die Stellung der Glykoproteide im System der Eiweifskörper einzugehen.

XVII.

Beiträge zur Lehre von der Säurevergiftung bei Hund und Kaninchen.

Von **K. Spiro.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

1.

Durch die Untersuchungen von F. Walter*) (Schmiedeberg), E. Salkowski**), C. Gaehtgens***) u. a. ist ein tiefgreifender Unterschied zwischen Hunden (Karnivoren) und Kaninchen (Herbivoren) gegenüber der Vergiftung mit Säuren festgestellt worden: Während diese bei einer Gabe Säure, welche 0,9 g Salzsäure pro Kilogramm Tier entspricht, unter einem ganz bestimmten Symptomenkomplex innerhalb einer gewissen Zeit zu Grunde gehen, sind jene einer solchen Dosis gegenüber refraktär. Den Grund dieses verschiedenen Verhaltens hat schon Walter klarzustellen vermocht, indem er zeigte, dafs die eingeführte Säure (bis zu 75 Proz.) im Hundeorganismus durch Ammoniak neutralisiert wird, während es beim Kaninchen zu einer Alkaliverarmung des Organismus kommt.

Diese Lehre, die für die Pathologie und Klinik so grofse Bedeutung erlangt hat†), haben C. Gaehtgens und in jüngster Zeit R. v. Limbeck††) und sein Schüler Winterberg†††) weiter auszubauen gesucht, indem sie zeigen wollten, dafs die ge-

*) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 7, 188, 1877.

**) Virchows Archiv 58, 1.

***) Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, 36, 1878.

†) Vergl. F. Kraus in Lubarsch-Ostertags Ergebnissen d. Pathologie II, 1895, S. 581.

††) Wien. klin. Wochenschr., Zeitschr. f. klin. Medizin 1898.

†††) Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 204.

nannte qualitative Differenz zwischen den beiden Tierarten nur als eine quantitative anzusehen sei, da die Herbivoren ebenso auf die Säurevergiftung mit einer vermehrten Ammoniakausscheidung reagieren wie die Karnivoren, und dafs letztere auch einen Alkaliverlust erleiden.

Bei fast allen diesen Versuchen wurde die Säure vom Verdauungstraktus aus gereicht. Da wegen der lokalen Wirkung der Säuren bei der innerlichen Darreichung nicht über ein gewisses Mafs hinausgegangen werden kann, so ist die Frage noch offen, ob nicht doch beim Hunde eine echte Säurevergiftung zu erzielen ist, was nach den erwähnten Befunden von Gaehtgens, R. v. Limbeck und Winterberg vermutet werden kann. Diese Frage läfst sich am besten durch intravenöse Vergiftung entscheiden, bei der ja die Einführung beliebiger Mengen in gegebener Frist und eine genaue Untersuchung von Blutdruck und Respiration ermöglicht wird.

Die hier allein in Betracht kommenden anorganischen Säuren und ebenso fast alle ihre sauren Salze können freilich nicht in die Blutbahn direkt eingeführt werden, da sie auf die Eiweifskörper des Blutes, dessen Gerinnbarkeit u. s. w. so stark einwirken, dafs gegenüber diesen lokalen Wirkungen die resorptiven kaum oder jedenfalls nicht rein zur Geltung kommen können. In Betracht kommt hier eigentlich nur die Phosphorsäure, deren Salze ja im Blute und den Geweben auch normalerweise vorkommen, und zwar unter Bedingungen, die auch auf das Vorkommen saurer Salze schliefsen lassen. Bekanntlich können wegen der Hydrolyse der Phosphate die verschiedenen Salze nebeneinander in Lösung bestehen, und der Übergang der einzelnen Gleichgewichte findet, wie man z. B. bei der Titration mit Lackmus beobachten kann, so langsam statt, dafs eine heftige lokale Wirkung der sauren Salze von vornherein nicht zu erwarten ist.

Abgesehen von A. Kunkel, der in seinem Lehrbuche der Toxikologie (Bd. I, S. 294) erwähnt, dafs mit dem sauren phosphorsauren Natron sehr leicht beim Kaninchen die Erscheinungen der allgemeinen Säurevergiftung hervorgerufen werden können, scheinen eingehendere Versuche über diesen Punkt nur von R. Kobert*) angestellt zu sein. Er benutzte, bei Nachprüfung älterer Angaben von Oré und P. Guttmann über die Wirkung direkt in die Blutbahn injizierter Säure, eine einwandsfreiere

*) Schmidts Jahrbücher 1878, S. 225—232.

Versuchsanordnung, indem er zur intravenösen Injektion Phosphorsäure wählte. In der That erzielte er damit ein Vergiftungsbild, das in vielen Punkten dem der resorptiven Säurevergiftung glich, in anderen jedoch davon nicht unerheblich abwich. So entsprechen die im Verlaufe der Vergiftung oft, besonders bei Injektion ins cavum peritonei, auftretenden schweren klonischen und tonischen Krämpfe, von deren Deutung noch weiter unten die Rede sein wird, nicht dem typischen Bilde der Säurevergiftung. Auch das Auftreten von zahlreichen Epithelien und hyalinen Cylindern im Harn sowie gelegentlich das von Blutfarbstoff, die Ungerinnbarkeit des überlebenden Blutes sind Vergiftungserscheinungen eigener Art. Kobert schlofs aus seinen Versuchen, dafs die Wirkung der Phosphorsäure sich der des sauren und neutralen Salzes eng anschliefst, resp. qualitativ — bis auf die Herzwirkung — mit ihr identisch ist.

Bei Versuchen über Diurese beobachtete ich an Kaninchen nach der intravenösen Einführung von Lösungen, die neben anderen Bestandteilen auch saures Phosphat enthielten, das typische Bild der Säurevergiftung. Ich habe diese Erscheinung weiter verfolgt, namentlich um zu sehen, inwieweit auch beim Hunde die Säurevergiftung möglich ist. Für die Immunität derselben, die freilich, wie ich gleich zeigen werde, nur als eine relative zu bezeichnen ist, kommt, aufser der Neutralisation durch zu diesem Zweck abgespaltenes Ammoniak, vielleicht noch ein anderer Faktor in Betracht, das Verhalten der Harnsekretion. Bekanntlich scheidet die Hundeniere ein saures Sekret ab, während das Kaninchen meist alkalischen Harn oder (bei Haferfütterung und im Hunger) nur relativ geringe Mengen eines etwas sauren Harnes liefert. Es war daher zu erwägen, ob nicht gegenüber der Säurevergiftung die Niere beim Hunde als entgiftendes Organ eine gröfsere Rolle spielen kann als beim Kaninchen, indem erstere einen gröfseren Teil der zugeführten sauren Äquivalente wegschaffen kann als letztere.

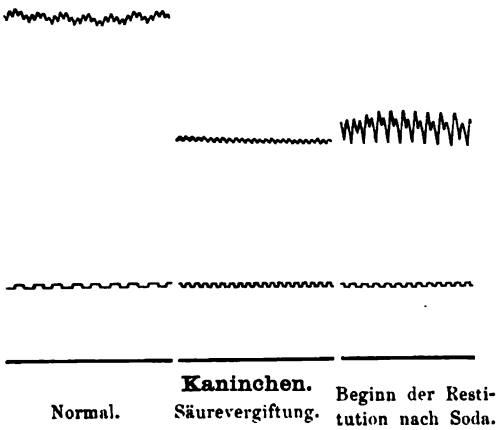
2. Verhalten von Zirkulation und Respiration.

Das zu den Versuchen angewandte primäre („saure“, „zweifach-saure“) phosphorsaure Natron, NaH_2PO_4, habe ich mir selbst dargestellt. In einem Teil der Versuche bin ich von Lösungen des schön krystallisierten Salzes ausgegangen; einfacher ist es, von Lösungen mit bekanntem Gehalt an sekundärem (einfach-

saurem) Salz auszugehen, dieselben mit käuflichen Phosphorsäurelösungen bis zur eben beginnenden Bläuung von Kongopapier zu versetzen, und die Lösungen bis zum gewünschten Gehalt zu verdünnen. Die Lösungen der Krystalle, namentlich wenn sie durch längeres Waschen mit Alkohol gereinigt waren, brauchen bis zur Neutralisation gegen Kongo immer noch einen oft nicht unerheblichen Zusatz von Phosphorsäure. Für den Versuch am Kaninchen empfehlen sich nicht zu saure Lösungen.

Beim Kaninchen lassen sich die Symptome der Säurevergiftung durch intravenöse Injektion der sauren Phosphatlösungen aufserordentlich schnell herbeiführen. Verwendet man eine 10proz. Lösung und injiziert in der Minute 2 ccm, so tritt zunächst eine vorübergehende Erhöhung des Blutdruckes ein, doch sinkt er bald darauf; die Pulse werden zuerst auch etwas stärker, bald aber sehr erheblich schwächer. Am meisten ändert sich die Respiration: die Frequenz der Atemzüge nimmt zunächst zu, sie werden dann tiefer, stärker, dabei mühsamer, namentlich die Exspiration ist angestrengt und lang gezogen. Sehr bald läfst die angestrengte Atmung nach, ihr dyspnoischer Charakter verschwindet, die Atemzüge werden ganz oberflächlich und schwach, Kollaps mit vollkommener Bewufstlosigkeit tritt ein, dann Tod ohne eine Spur von Krämpfen. Die Atmung sistiert vor dem Stillstande der Herzthätigkeit. Jedoch läfst sich, ganz wie in den Walterschen Versuchen, im Stadium des Kollapses eine Erholung erzielen, wenn rechtzeitig Soda injiziert wird. Sofort nimmt die Herzarbeit und die Respirationstiefe und -frequenz zu, der Kollaps schwindet, und eine ruhige Atmung bei erstarkten Pulsen, gehobenem Blutdruck zeigt die Wiederherstellung des Tieres an.

Fig. 1.



Der ganze Vorgang läfst sich übrigens, wie die beifolgenden Kurvenausschnitte (Fig. 1) zeigen, am Kymographion sehr deutlich demonstrieren, so dafs, zumal der ganze Versuch innerhalb einer

Stunde bequem durchgeführt werden kann, der bezeichnete Befund von Walter-Schmiedeberg in dieser Form als Vorlesungsversuch leicht zu demonstrieren ist.

Eine Alkalibestimmung des Blutes nach der von Dr. W. Pemsel und mir*) ausgearbeiteten Methode ergab bei einem Kaninchen vor der Vergiftung einen Wert von 169 mg NaOH, danach von 78 mg NaOH in 100 ccm Blut.

Auch beim Hunde läfst sich durch Injektion von saurem Phosphat eine echte Säurevergiftung erzielen; jedoch weicht der Versuch in einem Punkte sehr wesentlich von dem beim Kaninchen ab, wie der folgende Auszug aus einem Protokoll zeigen mag.

Ein Hund von 6 kg, dessen normaler Blutdruck 140 mm Hg betrug, erhält im Verlaufe von 25 Minuten 50 ccm einer 10proz. Lösung des Salzes. Dabei wird die Atmung frequenter und kleiner, und der Blutdruck sinkt bis auf 40 mm Hg. Mit dem Momente, wo nunmehr die Infusion sistieren gelassen wird, steigt sofort der Druck, und die Atmung nimmt in kurzer Zeit wieder den alten Typus an; während der Pause von 20 Minuten steigt der Blutdruck wieder bis zu 110 mm Hg. Eine neue (zweite) Injektion von 15 ccm (in fünf Minuten) bringt ihn von neuem herunter bis auf 38 mm Hg, während in der folgenden Pause er sich wiederum sofort bis zur Höhe von 90 mm Hg erhebt. Auch eine

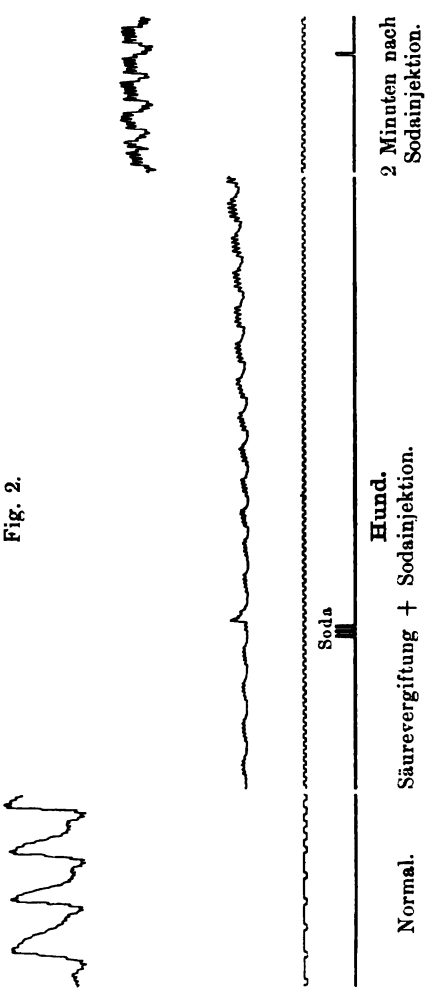


Fig. 2.

*) Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 233.

dritte Injektion von 35 ccm Flüssigkeit, die Blutdruck und Respiration sofort hinuntertrieb, wird in der darauf folgenden Pause überwunden. Eine darauf folgende vierte Injektion, bei der der Blutdruck bis auf 15 mm Hg sinkt, die Atmung ganz abflacht, wird jedoch nicht überwunden; in der Pause werden die Atemzüge immer schwächer, das vorher unruhige Tier liegt in tiefstem Koma (vergl. Kurve, Fig. 2, S. 273): es werden deshalb sofort 12 ccm einer 5 proz. Sodalösung ganz langsam injiziert, sogleich hebt sich die Herzaktion, die Atmung wird wieder tiefer, der Blutdruck steigt bei weiterer Sodadarreichung innerhalb 10 bis 15 Minuten bis zur Höhe von 100 mm Hg.

Man sieht in diesem Versuche sehr deutlich, wie prompt der Regulationsmechanismus des Hundes reagiert, so dafs zu einer Zeit die Erholung bei ihm noch möglich ist, wo sie beim Kaninchen nicht mehr möglich erscheint. —

Die Säurevergiftung beim Hunde ist weiterhin dadurch erschwert, dafs die anzuwendende Dosis nach meinen Erfahrungen nicht unerheblich schwankt; offenbar vertragen gröfsere Tiere auch eine relativ gröfsere Gabe als kleine, für die sich im allgemeinen 2 bis 3 g Salz pro Kilogramm Tier als tödliche Dosis erwiesen. Man ist jedoch bei diesen Versuchen stets auf die Kontrolle durch Blutdruck und Respiration angewiesen, und es empfiehlt sich auch die Infusion nicht absatzweise, sondern stetig, und, was von grofser Wichtigkeit, mit steigender Geschwindigkeit auszuführen.

Dafs es sich bei meinen Versuchen um eine echte Säurevergiftung handelt, haben mir auch Analysen des Blutes gezeigt. Eine Alkalescenzbestimmung ergab beim intravenös vergifteten Hunde eine Abnahme der Blutalkalescenz um 85 mg NaOH pro 100 ccm, während Herr Dr. W. Pemsel und ich in früheren Versuchen bei Darreichung per os, worüber gelegentlich berichtet werden soll, gar keine Änderung sahen.

Einige Gasanalysen*) ergaben folgendes Resultat:

I. Ein Hund von 15 kg erhielt im Verlaufe von $1^1/_2$ Stunden 370 ccm einer 10 proz. Phosphatlösung in die Vena femoralis injiziert. Nach der Blutdruck- und Respirationskurve zu schliefsen ist die Vergiftung hochgradig.

Blutmenge	28,847 ccm
Gewonnene Gasmenge	5,406 „
Gase nach Absorption der CO_2 .	2,735 „

*) Herrn Kollegen Dr. S. Weber, Assistenten am hiesigen pharmakologischen Institute, möchte ich auch an dieser Stelle für sein freundliches Entgegenkommen und seine wertvolle Mitarbeit bei diesen Versuchen meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Gase im Eudiometer	3,3195 ccm
„ nach Zuleitung von H_2 . .	15,595 „
„ nach der Explosion . . .	8,673 „

Demnach in 100 Vol. Blut:

Gesamtgase	18,74 Vol.
CO_2	9,49 „
O_2	8,20 „
N_2	1,05 „

II. Ein Hund von 11 kg erhält im Verlaufe von $1^1/_2$ Stunden 250 ccm einer 10proz. Phosphatlösung, die genau gegen Kongo neutralisiert ist. Die Injektion findet mit steigender Geschwindigkeit (erst $^1/_2$, dann 1, dann 2, dann 3 ccm pro Minute) statt. Der Druck sinkt von 140 mm Hg auf 50 mm. In einer Pause von fünf Minuten hebt er sich auf 60 mm Hg. Eine erneute Injektion von 12 ccm läfst den Druck auf 30 bis 40 mm fallen (Blutentnahme).

Blutmenge	27,254 ccm
Gewonnene Gasmenge	2,768 „
Gase nach Absorption der CO_2 .	2,324 „
„ im Eudiometer	2,210 „
„ nach Zuleitung von H_2 . .	9,863 „
„ „ der Explosion . . .	4,780 „

Demnach in 100 Vol. Blut:

Gesamtgase	10,168 Vol.
CO_2	1,629 „
O_2	6,536 „
N	2,003 „

In dem zweiten Versuche ist auch die gefundene Menge Sauerstoff auffallend klein; es erklärt sich dies, auch abgesehen etwa von einer Morphinwirkung, hinreichend aus der bei jeder Salzinfusion bemerkbaren, durch Hämoglobinbestimmung leicht zu konstatierenden Blutverdünnung. Man erkennt die Kohlensäureverarmung bei Betrachtung folgender Zahlen: Während sonst das Verhalten von $O_2 : CO_2$ ungefähr gleich 1 : 3 ist, ist es hier gleich 1 : $^1/_4$; die vorhandene Menge Sauerstoff gleich 10 gesetzt, wäre die Kohlensäuremenge gleich 2,49. Diese Werte entsprechen denen, die Walter bei den schwersten Säurevergiftungen gefunden hat. (Auch bei ihm ist merkwürdigerweise die, sonst relativ ungiftigere, Phosphorsäure die wirksamste Säure.)

Da am Hunde besser als am Kaninchen, und bei der akuten intravenösen Vergiftung besser als bei der langsamen stomachalen, die Veränderungen von Respiration und Zirkulation hervortreten,

so sollen die Befunde einer Vergiftung nach Vagotomie angeführt werden. (Vergl. Fig. 3.) Hier sieht man zunächst die Atmung sich abflachen, so dafs die Vagus-Schwankungen der Respiration bald fast völlig verschwinden. Der Blutdruck sinkt sofort, gleichzeitig tritt eine Verlangsamung der Herzaktion ein, die zur vermehrten Füllung des Herzens führt, so dafs zunächst trotz des niedrigen Blutdrucks das Pulsvolumen das gleiche bleibt. Allmählich nimmt jedoch die Pulsfrequenz und das Pulsvolumen stetig ab, wobei gegen das Ende hin auch ein periodisches An- und Abschwellen der Herzaktion erkennbar wird. Eine folgende Sodainjektion hebt, wie schon hervorgehoben, etwas den Blutdruck, noch charakteristischer ist die unmittelbar sich einstellende Beschleunigung und Volumenvergröfserung des Pulses, die beide die gesteigerte Herzaktion erkennen lassen.

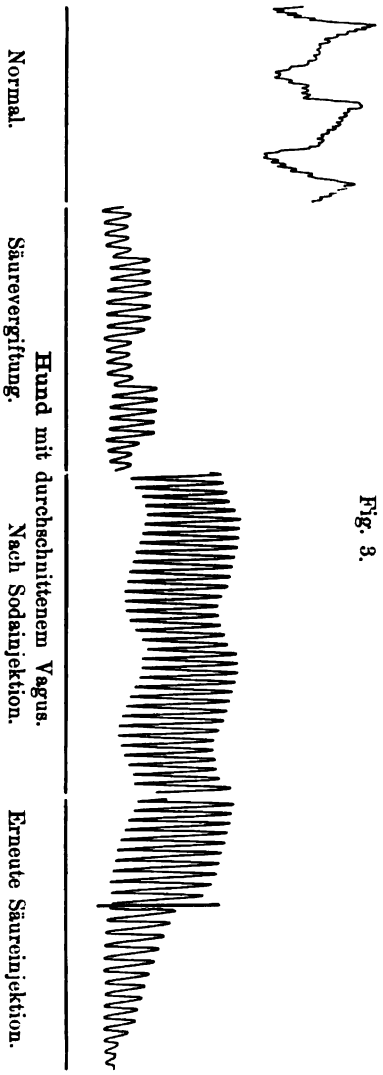


Fig. 3.

An einem mit Säure vergifteten Tiere konnte ich auch einmal durch Injektion eines Nebennierenpräparates eine eklatante Wirkung erzielen. Die Blutdrucksteigerung war freilich gering, wohl aber wurde das Herz wieder zu kräftiger Thätigkeit angeregt, ein Befund, der die Herzwirkung des Nebennierenextraktes (R. Gottlieb) aufs beste demonstrierte.

Wenn somit ebenso wie beim Kaninchen auch beim Hunde durch saures Phosphat eine typische Säurewirkung (charakteristisches Vergiftungsbild mit Koma, Alkalescenzverminderung des Blutes, Restitution durch Soda) zu erzielen ist, so mufs doch hervorgehoben werden, dafs das Salz

infolge ungeeigneter Darreichung beim Hunde auch einen ganz anderen Symptomenkomplex hervorrufen kann: die Salzvergiftung. Durch die eingehenden Untersuchungen aus dem Prager pharmakologischen Institut von F. Hofmeister und seinen Schülern, namentlich E. Münzer*), haben wir dies Symptomenbild genauer kennen gelernt, bei dem die Änderungen an Respiration und Zirkulation gering sind (sogar Blutdrucksteigerung eintritt), dagegen neben der Diurese die klonischen und tonischen Krämpfe besonders hervortreten. Beim Kaninchen habe ich auf saures Phosphat nie eine typische Salzvergiftung eintreten sehen, immer nur Säurevergiftung, dagegen beim Hunde beide Vergiftungsbilder, resp. sehr häufig eine Mischung von beiden. Vor einem Irrtum in der Deutung schützt leicht die Untersuchung der Herz- und Atmungsthätigkeit; auf die „Salzwirkung" des sauren Phosphats komme ich im folgenden Kapitel noch näher zu sprechen.

3. Verhalten der Harn- und Lymphabsonderung.

Die diuretische Wirkung des sauren Phosphats wurde beim Hunde und beim Kaninchen aus dem Grunde untersucht, weil ein Unterschied zwischen beiden Tierarten nicht unwahrscheinlich war; eine solche Differenz konnte eventuell in Beziehung stehen zu jener wiederholt erwähnten Differenz, die sie gegenüber per os gereichter Säure zeigen.

Über die diuretische Wirksamkeit der Phosphate liegen Angaben bisher nur für das sekundäre Salz vor, die sich aber widersprechen. Während nämlich v. Limbeck**) fand, dafs es die Harnsekretion „nicht auffällig steigert", sah Münzer***) eine starke diuretische Wirkung. Nach meinen oft wiederholten Versuchen (die Anordnung war hier und bei den folgenden Versuchen die übliche: Blasen- resp. Ureterenkanüle etc.) kann ich nur letzterem beistimmen, da 120 bis 170 Proz. des mit den Salzlösungen injizierten Wassers wieder im Harn erschienen.

Das primäre Phosphat zeigt dagegen beim Kaninchen ein ganz anderes Verhalten als das sekundäre Salz. Die Diurese ist ungefähr ein Drittel so stark, sie betrug, in mehreren Versuchen gut übereinstimmend, nur zwischen 50 bis 60 Proz.,

*) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **41**, 74.
) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **25, 69.
***) Ebendas. a. a. O.

und niemals übertraf oder erreichte die Quantität des Harns, auch nicht auf der Höhe der Diurese, die in derselben Zeitperiode injizierte Flüssigkeitsmenge. (Gegenüber den Befunden von Kobert bei Injektion von Phosphorsäure möchte ich jedoch hervorheben, dafs der Harn immer frei von pathologischen Bestandteilen, wie Eiweifs, Epithelien, Cylindern, Blut, war und blieb.)

Wenn somit das primäre Phosphat bezüglich der Diurese von den anderen Salzen abweicht, so ist dies von vornherein mit aller Wahrscheinlichkeit auf die Wirkung der Säureionen zurückzuführen. Dies zeigt evident das Parallelgehen der Harnkurve mit dem Verlaufe der Vergiftung, speziell der Alkalescenzverminderung. Ist das Koma eingetreten, so sistiert beim Kaninchen auch die Harnsekretion. Injiziert man dann Sodalösung, so tritt sofort Diurese ein; es wird ein an saurem Phosphat aufserordentlich reicher Harn sezerniert. Offenbar haben sich die Epithelien (der Harnkanälchen) an dem sauren Salz angereichert, während die Glomerulusthätigkeit darniederlag und erst durch das Alkali wieder angeregt wird. Die Menge des Harns kann nach der Sodainjektion bis zu 200 Prozent der injizierten alkalischen Flüssigkeit erreichen. Dies zeigt deutlich, wie sehr die Nierenthätigkeit beim Kaninchen durch die Alkalescenz des Blutes beeinflufst wird: Die Verminderung der Hydroxylionen ist vermutlich der Grund, dafs die Salzdiurese nach Injektion von saurem Phosphat so gering wird. Die Konzentration an saurem Phosphat, die maximal im Harn auftreten kann, ist nicht gering: Der Gehalt an saurem Phosphat in dem nach dem Koma entleerten Harn entsprach pro Kubikzentimeter 2,4 ccm Uranlösung.

Während somit beim Kaninchen vom sauren Phosphat wesentlich nur die H-Ionen wirken, die molekulare Salzwirkung dagegen im gesamten Vergiftungsbilde und bei der Diurese zurücktritt, zeigt der Hund — namentlich quantitativ — ein durchaus anderes Verhalten. Injiziert man ihm konzentrierte Lösungen des sauren Salzes, zwar wenn auch schnell doch gleichmäfsig, so kann man bei ihm typische Salzwirkung und auch Diurese erzielen. Letztere betrug z. B. in dem folgenden Versuche insgesamt über 200 Proz. und in einzelnen Zeitintervallen bis zu 270 Proz. Die Salzwirkung war auch sonst typisch, indem der Blutdruck nur vorübergehend sank, sich aber bis fast gegen das Ende auf einer beträchtlichen Höhe (100 mm) erhielt, die Respiration frequent und angestrengt war, aber namentlich zum Schlusse heftige Krämpfe

eintraten und eine Sodainjektion am sterbenden Tiere ohne jeden Einfluſs war! Der Versuch sei, weil die Kurve der Phosphorsäureausscheidung sehr charakteristisch, in extenso mitgeteilt.

Hündin, 10 kg.

Morphin-Äther-Narkose. Blasenkanüle. Injektionsflüssigkeit 10proc. NaH_2PO_4
Normale Harnmenge = 3 ccm in 10 Minuten.

Zeit	Harnmenge ccm	Injizierte Flüssigkeit ccm	Gesamt-P_2O_5 = ccm Uranlösung	Saure P_2O_5 = ccm Uranlösung
3h 18m bis 3h 28m	12	21	—	0,869
3h 28m „ 3h 38m	32	54	—	1,60
3h 38m „ 3h 48m	38,5	70	—	1,70
3h 48m „ 3h 58m	45,5	90	—	1,75
3h 58m „ 4h 08m	47	108	3,21	2,12
4h 08m „ 4h 18m	49	128	3,25	2,20
4h 18m „ 4h 28m	53	148	3,28	2,26
4h 28m „ 4h 38m	55	168	3,20	2,40(?)
4h 38m „ 4h 48m	54	186	3,25	2,26
4h 48m „ 4h 58m	56	210	3,22	2,39
4h 58m „ 5h 08m	53	230	3,27	2,50
5h 08m „ 5h 18m	51	248	3,22	2,64
5h 18m „ 5h 28m	50	270	3,42	2,82
5h 28m „ 5h 38m	47,5	292	3,46	2,99
5h 38m „ 5h 48m	46,5	316	4,21	3,23
5h 48m „ 5h 58m	47	338	4,22	3,28
5h 58m „ 6h 08m	38	356	4,24	3,38
6h 08m „ 6h 18m	39	376	4,24	3,64
6h 18m „ 6h 28m	37	398	4,33	3,69
6h 28m „ 6h 38m	23	416	4,46 (?)	3,60
6h 38m „ 6h 48m	11	413	—	3,67

So hochgradige Diuresen sieht man bei echter Säurevergiftung freilich nicht immer, aber doch häufig; fast stets ist die Diurese sehr viel stärker als beim Kaninchen: Wiederholt sah ich, wie die Niere trotz schwerer Säurevergiftung und hochgradiger Blutdrucksenkung (30 bis 40 mm Hg!) ihre Thätigkeit fortsetzte und 5 bis 10 ccm Harn in zehn Minuten lieferte. Auch jener Hund, dessen Blut bei der Gasanalyse so kohlensäurearm gefunden wurde, hatte eine Diurese von über 200 Proz. gezeigt. Worauf die starken, auch sonst in diuretischen Versuchen oft störenden Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen beruhen, kann ich bislang nicht angeben.

Die Konzentration an Gesamtphosphorsäure im Harn ist beim Hunde höher als beim Kaninchen, seine Menge sauren Phosphats

kann bis zu einem Gehalt steigen, der über 3,5 ccm Uranlösung pro Kubikzentimeter Harn entspricht.

Auch bezüglich der Lymphabsonderung wirkt das saure Phosphat beim Hund etwa wie andere Salze.

Bei einer Hündin von 16 kg betrug die Lymphabsonderung in je acht Minuten normal 1,3, 1,2, 1,4 ccm, bei einer gleichmäfsigen Injektion von saurem Phosphat war sie weiterhin: 2,5, 4,5, 8, 10,5, 11,5 ccm; infolge der starken Blutdrucksenkung wurde eine Pause von acht Minuten mit der Infusion gemacht, während deren die Lymphabsonderung 12,5 ccm betrug. Bei einer erneuten Injektion war dieselbe = 9,5, 8 und 9 ccm; als infolge der Respirations- und Zirkulationsverhältnisse nunmehr Soda injiziert werden mufste, waren die entsprechenden Lymphmengen 9,5, 8 und 7,5 ccm. (Die nach Soda ausgeschiedene Lymphe war auffallend schwer gerinnbar.)

Wie man sieht, ist der Lymphflufs beim Hunde ohne erkennbare Abhängigkeit von der Alkalescenz des Blutes, was mit den bezüglich der Diurese gefundenen Thatsachen gut übereinstimmt.

Überblicken wir die vorliegenden Versuche, so ergiebt sich, dafs das saure Phosphat auf die Diurese bei Hund und Kaninchen einen, wenn auch nur quantitativ, so doch recht wesentlich verschiedenen Einflufs ausübt: die Diurese beim Hunde ist viel reichlicher, und die gröfseren Mengen Harn zeigen zudem einen höheren Gehalt an Gesamtphosphorsäure, namentlich an sauren Phosphaten. Dadurch vermag sich der Hundeorganismus eines gröfseren Teiles des schädlichen Agens zu entledigen, was das Kaninchen in diesem Grade nicht kann. Doch möchte ich diesem Punkte nicht denselben Wert für die Resistenz der Hunde gegen Säurevergiftung beimessen, den die Ammoniakbildung hat; denn gegenüber der grofsen zur Vergiftung nötigen Menge von Säureionen steht die von der Hundeniere eliminierbare Menge doch arg zurück.

Unser Befund verdient vielleicht noch von einem anderen Gesichtspunkte aus einiges Interesse. Die hier beobachtete auffallende Resistenz der Hundeniere gegen solche schädlichen Eingriffe, die auf die Harnbereitung der Kaninchen heftig einwirken, findet ihr Analogon in anderen diuretischen Versuchen: Sind doch auch das Koffein und seine Homologen auf die Diurese des Hundes ohne Wirkung, während sie die der Kaninchen in stärkstem Mafse beeinflussen. Strafsburg i. E., Juli 1901.

XVIII.

Über die Bindung des Quecksilbers und Arsens durch die Leber.

Von Dr. **B. Slowtzoff** (Petersburg).

1.

Die Leber hat, wie man schon lange weifs, die Fähigkeit, gewisse Gifte, welche zu ihr mit dem Blute gelangen, zurückzuhalten und damit den Organismus vor Vergiftung zu schützen. So haben Roger[1]), Heger[2]), Lautenbach[3]), Jacques[4]), Gley[5]) und andere festgestellt, dafs eine bestimmte Menge von Strychnin, Morphin, Cocain durch die Leber zurückgehalten wird. Dasselbe gilt auch für einige anorganische Gifte, namentlich Schwermetalle, z. B. Kupfer, Blei, Zink u. a. Obgleich wir für verschiedene Substanzen das Mafs des Entgiftungsvermögens kennen, ist der Chemismus dieser Entgiftung bisher unaufgeklärt. Aus der Litteratur des Gegenstandes kann man immerhin einige Andeutungen über denselben finden. So ist aus den Arbeiten Bunges und seiner Schüler ersichtlich, dafs das Eisen in der Leber nicht allein in der Form des Ferratins zurückbleibt, sondern auch die Nukleine der Leber eisenhaltiger macht. Die Untersuchungen von Blum[6]) und Oswald[7]) über die Eiweifskörper der Schilddrüse haben wahrscheinlich gemacht, dafs auch das Jod sich im Schilddrüsenprotoplasma mit einem bestimmten Globulin zu verbinden vermag. Gautier[8]) und Stassano[9]) glauben ferner bewiesen zu haben, dafs Arsen in den Geweben und in den Leukocyten hauptsächlich an die Nukleine gebunden ist. Der letztere meint sogar, dafs sich überhaupt alle Gifte mit Nukleinen oder mit Nukleinsäuren verbinden.

Es schien mir interessant, die entgiftende Funktion der Leber näher zu untersuchen, um dadurch in die Art der Verbreitung von

Giften im tierischen Protoplasma einen Einblick zu gewinnen. Ich hielt es für das beste, mit der Leber zu beginnen, da an derselben die entgiftende Funktion am deutlichsten hervortritt. Ich ging dabei von den anorganischen Giften (Salzen des Quecksilbers und Arsens) aus, da die Methoden zum Nachweis derselben in den Geweben einwandsfrei ausgearbeitet sind. Meine ersten Versuche wurden alle mit kleinen Mengen der Gifte durchgeführt, um die Leber möglichst wenig zu schädigen und um besser zu sehen, wo die Ansammlung des Giftes beginnt.

Der mikroskopische und makroskopische Bau der Leber ist sehr eingehend studiert, die chemische Zusammensetzung derselben jedoch noch wenig erforscht. Nach Angabe von Halliburton[10]) enthält die Leber 74 bis 80 Proz. Wasser, 24,78 bis 18,65 Proz. organische und 1,07 Proz. anorganische Substanzen. Die letzteren bestehen nach älteren Angaben von Oidtmann[11]) aus 25,17 Proz. Kaliumoxyd, 14,17 Proz. Natriumoxyd, 3,62 Proz. Calciumoxyd, 0,19 Proz. Magnesia, 2,75 Proz. Eisenoxyd, 43,3 Proz. Phosphorsäure, 0,91 Proz. Schwefelsäure, 0,27 Proz. Kieselsäure, 2,5 Proz. Chlor und Spuren von Mangan, Kupfer und Blei. Was die organischen Bestandteile der Leber betrifft, so bestehen sie aus verschiedenen Extraktivstoffen, Lecithin, Fett, Glykogen (bis 10 Proz.) und Eiweifskörpern. Die letztgenannten Substanzen sind eingehend von Plósz[12]) und später von Halliburton[13]) untersucht worden.

Diesen Autoren zufolge zeigt das frische Lebergewebe alkalische Reaktion, welche bei der Totenstarre in neutrale oder sogar in saure übergeht; das ganze Gewebe wird dabei undurchsichtig und fest. Diese Erscheinungen beruhen nicht auf der Gerinnung des Eiweifses, wie das im Muskelgewebe der Fall ist, sondern sind lediglich durch Erstarren des Fettes bedingt.

Plósz teilt die Eiweifskörper der Leber in fünf Gruppen:

I. Eiweifskörper, die in physiologischer Kochsalzlösung und in Wasser löslich sind.

1. Eiweifs, welches bei 70° C. gerinnt und bei der Pepsinsalzsäureverdauung keinen Niederschlag giebt.
2. Ein Nukleoproteid, welches bei 70° C. gerinnt und bei der Pepsinsäureverdauung einen unlöslichen phosphorhaltigen Niederschlag liefert.
3. Ein Alkalialbuminat.

II. Eiweifskörper, die in 10prozentiger Chlornatriumlösung löslich sind.

4. Ein Globulin, welches bei 75° C. gerinnt und bei der Verdauung keinen Niederschlag giebt.

III. Eiweifskörper, die sowohl in Wasser, wie in 0,75prozentiger und 10prozentiger Kochsalzlösung unlöslich sind.

5. Kernnuklein.

Halliburton hat das Plószsche Schema abgeändert; er hat kein Nukleoproteid in der Leber gefunden, hat aber die Leberglobuline in drei Gruppen nach ihren Gerinnungstemperaturen (45°, 56°, 70° C.) getrennt.

Bei meinen Versuchen habe ich die Eiweifskörper der Leber in drei Fraktionen geteilt; die erste war in physiologischer Kochsalzlösung löslich (1, 2 und 3 des Plószschen Schemas); die zweite war löslich in 10prozentiger Kochsalz- und 6prozentiger Chlorammoniumlösung; die dritte war in allen oben erwähnten Lösungen unlöslich. Die erste Gruppe werde ich in der folgenden Beschreibung der Kürze wegen Albumin-, die zweite Globulin- und die dritte Stromafraktion nennen.

2. Die Lokalisation des Quecksilbers.

Der Nachweis des Quecksilbers geschah folgendermafsen. Die Gewebe oder die gewonnenen Präparate der Eiweifskörper wurden durch Oxydation zerstört. Zur klaren Lösung fügte ich Schwefelsäure (3 Proz.) und Salzsäure (3 Proz.), brachte in das Gemisch einen feinen Kupferdraht, und stellte das Gefäfs in den Thermostaten. Nach 24 bis 48 Stunden konnte ich den Draht, auf den sich das Quecksilber niedergeschlagen hatte, mit Wasser, verdünnter Natronlauge, Spiritus und Äther abwaschen, trocknen und das Quecksilber in der Form von Quecksilberbijodid sublimieren. Vorversuche hatten gezeigt, dafs man nach dieser Methode noch 0,0003 g Sublimat in einem Kilo des Gewebes ganz sicher nachweisen kann. Später hat es sich als praktisch erwiesen, das zu untersuchende Präparat, anstatt es zu oxydieren, nur eine Stunde lang mit 3 Proz. Schwefelsäure zu kochen, dann die nötige Menge Salzsäure hinzuzufügen und den Kupferdraht einzubringen. Die Bestimmung geht auch so ganz glatt von statten.

Nach diesen Vorbemerkungen lasse ich die Versuchsprotokolle in kurzer Form folgen.

Versuch 1.

Eine Hündin (15 Kilo schwer) bekam durch drei Wochen täglich mit der Nahrung 0,01 Sublimat. Das Tier wurde getötet, das Blut aus der Leber mit kalter physiologischer Kochsalzlösung von der Vena portae aus ausgewaschen, dann die Leber zerhackt und mit kalter physiologischer Kochsalzlösung ausgezogen. Die Extraktion wurde fortgesetzt, bis kein Albumin mehr in Lösung ging, dann die Flüssigkeit vom Gewebsrückstand abfiltriert und das Filtrat auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde dann mit 6prozentiger Chlorammoniumlösung ausgezogen, das abfiltrierte Extrakt zur Trockne gebracht. Der dann noch gebliebene Rückstand wurde gleichfalls getrocknet. Alle drei Fraktionen wurden nach Oxydation auf Quecksilber geprüft. Albuminfraktion und Stroma enthalten kein Quecksilber. Die Globulinfraktion giebt eine deutliche Reaktion.

Versuch 2.

Ein Hund (10 Kilo schwer) bekam täglich durch 30 Tage 0,02 Sublimat mit der Nahrung. Versuchsanordnung wie im vorigen Versuch, blofs wurde die Extraktion der Globulinfraktion mit 10proz. ClNa-Lösung vorgenommen. Albumin- und Stromafraktion enthalten kein Quecksilber. Die Globulinfraktion giebt eine kräftige Reaktion.

Diese Resultate zeigen unzweideutig, dafs die Lokalisation des Quecksilbers in der Leber gesetzmäfsig und eigenartig verläuft. Es war noch festzustellen, dafs die gewonnenen Resultate nicht blofs ein Produkt der Methodik, etwa veranlasst durch die angewandten Lösungsmittel (ClNa und $ClNH_4$) sind. Einige Kontrollversuche genügten zur Bestätigung der angeführten Resultate.

Versuch 3, 4, 5.

Frische Rindsleber wurde zerhackt und mit kleinen Mengen physiologischer Kochsalzlösung zu Brei zerrieben. Der Brei wurde dann in vier Portionen geteilt, mit wechselnden Mengen von Sublimat (0,01 Proz., 0,02 Proz., 0,1 Proz. und 0,2 Proz.) versetzt und 24 Stunden im Thermostaten belassen. Dann wurden alle Portionen genau so verarbeitet wie in den vorigen Versuchen. Bei den Proben mit 0,01 Proz. bis 0,02 Proz. Sublimat blieb das ganze Quecksilber in Lösung und ging in die Albuminfraktion über. Bei den Proben mit 0,1 Proz. bis 0,2 Proz. blieb nur ein Teil des Quecksilbers in Lösung, der andere Teil verband sich mit den Globulinen und Nukleinen so, dafs die Reaktion auf Quecksilberjodid in allen drei Fraktionen des Breies eintrat. Ich habe denselben Versuch noch einige Male wiederholt und immer mit dem gleichen Resultat.

Dieser Unterschied in der Bindungsart des Sublimats in der lebenden und in der toten Leber führte mich zu dem Schlufs

dafs die Bindung des Quecksilbers durch Globuline oder andere Substanzen, welche in 10proz. Chlornatrium- oder 6proz. Chlorammoniumlösung übergehen, einen vitalen Vorgang in den Leberzellen darstellt. Es bleibt noch die Frage zu entscheiden, ob das Quecksilber wirklich eine chemische Verbindung mit den Eiweifskörpern der Leber eingeht, oder ob in der sogenannten Globulinfraktion nur ein mechanisches Gemenge von Eiweifskörpern und Quecksilbersalz vorliegt.

Versuch 6.

Ein schwarzer Hund (8 kg schwer) bekam durch 15 Tage mit der Nahrung 0,01 Sublimat. Das Blut wurde aus der Leber mit kalter physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, der Leberbrei wie bei den vorigen Versuchen extrahiert und die drei Fraktionen auf Quecksilbergehalt untersucht. Albuminfraktion und Stroma enthielten kein Quecksilber. Die Globulinfraktion gab eine positive Reaktion. Aus der Globulinfraktion wurden die Eiweifskörper mit drei Volumina absoluten Alkohols bei neutraler Reaktion gefällt. Bei langsamem Zusatz des Alkohols blieb das ganze Quecksilber im Eiweifsniederschlag, bei raschem Zugiefsen ging ein Teil des Quecksilbers in die alkoholische Lösung.

Nach Fällung der Eiweifskörper durch Kochen mit verdünnten Säuren (Essigsäure 0,5 Proz., Salzsäure 0,01 Proz.) blieb das Quecksilber in Lösung.

Versuch 7.

Ein Hund (15 kg) erhielt täglich (20 Tage) 0,02 Sublimat mit der Nahrung. Verarbeitung der Leber wie oben. Der salzhaltige Auszug wird im Pergamentschlauch dialysiert, das ausgefallene Globulin mit Wasser ausgewaschen; es enthält Quecksilber. Man kann den Niederschlag mehrmals in Salzlösung lösen und durch Dialyse fällen. Das Quecksilber bleibt an das Globulin gebunden.

Versuch 8.

Ein Hund (Dachs) (8 kg schwer) erhielt durch 10 Tage 0,02 Sublimat in der Nahrung. Die Verarbeitung erfolgte wie vorher. Das Quecksilber ging nur in die Globulinfraktion über. Bei der Fällung der Eiweifskörper mit Salzen (Natrium- und Ammoniumsulfat) fällt das Quecksilber mit dem Globulin. Durch wiederholte Fällung und Lösung kann der Niederschlag gereinigt werden, ohne dafs er das Quecksilber verliert.

Die gesamten mitgeteilten Thatsachen machen es wahrscheinlich, dafs in der Leber bei Sublimatvergiftung ein quecksilberhaltiges Globulin entsteht und dafs das Quecksilber zuerst den Globulinanteil des Protoplasmas sättigt.

Die Verbindung des Globulins und Quecksilbers ist sehr locker und zerfällt beim Kochen mit Säuren, sie bleibt aber intakt, wenn man sie dialysiert, aussalzt oder mit Alkohol fällt, obgleich letzterer ein vorzügliches Lösungsmittel für Sublimat ist.

3. Die Lokalisation des Arsens.

Die Bindung des Arsens durch die Leber habe ich nach demselben Verfahren untersucht wie jene des Quecksilbers. Der Nachweis des Arsens geschah nach Gautiers[14]) Verschrift im Marshschen Apparat. Natürlich waren alle Reagentien vorher auf Arsenfreiheit geprüft.

Versuch 9.

Ein Hund erhielt durch 7 Tage je 0,002 As_2O_3 mit der Nahrung. Das Blut wurde von der Pfortader aus durch kalte physiologische Kochsalzlösung verdrängt. Alles Arsen war im Stroma enthalten. Albumin- und Globulinfraktion waren arsenfrei.

Versuch 10.

Ein Hund (12 kg schwer) erhielt durch 7 Tage je 0,001 As_2O_3 mit der Nahrung. Die mit 0,75proz. und 10proz. Kochsalzlösung hergestellten Auszüge wurden durch Erhitzen bei schwach saurer Reaktion koaguliert, der gewaschene Niederschlag (Albumin und Globulin), sowie die Filtrate sind arsenfrei. Arsen findet sich nur in dem Stroma.

Versuch 11.

Ein Hund (15 kg) erhält täglich durch 28 Tage 0,001 As_2O_3 mit der Nahrung. Albumin- und Globulinfraktion sind arsenfrei. Das Stroma der Leber wird 48 Stunden bei Körpertemperatur mit Pepsinsalzsäure verdaut. Der Rückstand enthält das Arsen, die gelösten Bestandteile sind arsenfrei.

Versuch 12.

Ein Hund (13 kg schwer) bekam täglich durch 28 Tage 0,001 As_2O_3. Albumin- und Globulinfraktion arsenfrei. Das Leberstroma wurde mit $^1/_4$ proz. NaHO extrahiert, die Lösung abfiltriert und das gelöste Eiweifs mit Essigsäure gefällt. Der Rückstand sowie das ausgefällte Eiweifs enthielten Arsen; das Filtrat nach der Neutralisation des alkalischen Auszuges war arsenfrei. Der Rückstand wurde nach der Extraktion mit $^1/_4$ proz. Natronlauge in 2 proz. Lauge gelöst, abfiltriert und mit Essigsäure gefällt. Der an Nuklein reiche Niederschlag enthielt das gesamte Arsen. Man konnte die arsenhaltigen Nukleine drei- bis viermal in Natronlauge lösen und fällen, ohne dafs Arsen dabei abgespalten wurde.

Versuch 13.

Ein Hund (10 kg schwer) bekam durch drei Wochen alle zwei Tage 0,001 As_2O_3 in der Nahrung. Albumin- und Globulinfraktion erwiesen sich als arsenfrei. Das Stroma wurde mit $^1/_4$- und $^1/_2$ proz. Natronlauge extrahiert, die gewonnene Lösung abfiltriert und mit Säure ausgefällt. Das Arsen blieb immer in dem Nukleinniederschlag.

Versuch 14.

Ein Hund (11 kg) bekam alle zwei Tage 0,001 As_2O_3. Albumin- und Globulinfraktion waren arsenfrei. Das Stroma wurde mit 0,3 proz. Salzsäure angerührt und in den Thermostaten gebracht. Nach 24 Stunden wurden zur gequollenen Masse 100 ccm Magensaft gefügt; nach einer Stunde wurden die gelösten Teile abfiltriert. Der Niederschlag (Nukleine) enthielt Arsen; aber auch die Lösung, in welcher nach Iljin [15]) Nukleoglobuline vorhanden sind, war arsenhaltig und lieferte bei längerer Verdauung einen unlöslichen, phosphorhaltigen Nukleinrückstand, welcher gleichfalls arsenhaltig war.

Die Kontrollversuche mit Mischungen von Arsenlösung und Leberbrei zeigten, dafs an dem toten Gewebe keine solche Regelmäfsigkeit in der Bindung des Arsens zu erkennen ist.

Das Arsen wird also durch die Lebernukleine gebunden und giebt dabei eine beständige Verbindung, welche durch Alkali ($^1/_4$ bis 2 Proz. NaHO) und auch durch Säuren (0,5 Proz. Essigsäure, 0,3 Proz. Salzsäure) nicht zerstört wird. Bei der Pepsinsalzsäureverdauung entsteht aus ihr ein nukleinhaltiger Niederschlag, welcher Arsen enthält.

Man sieht, dafs die Bindung des Arsens und des Quecksilbers durch die lebende Leberzelle in ganz verschiedener Weise erfolgt, indem das Arsen dabei viel beständigere chemische Verbindungen liefert als das Quecksilber.

Wenn man aber diese Verbindungen als Eiweifsverbindungen ansieht, so erscheint es verständlich, warum gemästete Tiere besser gegen Vergiftung geschützt sind als hungernde. Roger nimmt an, dafs hier der Glykogengehalt der Leber beteiligt ist, ich möchte aber der Meinung Ausdruck geben, dafs der hohe Glykogengehalt nur einen guten Ernährungszustand beweist, welcher seinerseits mit einem erhöhten Eiweifsgehalt der Leber einhergeht.

So ist aus der Arbeit von N. Umikoff [16]) zu ersehen, dafs der Gehalt der Leber an Eiweifskörpern bei hungernden und gemästeten Tieren verschieden ist.

Eiweifsgehalt der Leber bei Kaninchen.

	Gemästete Tiere	Hungernde Tiere
Trockensubstanz	32,30 Proz.	28,19 Proz.
Gesamteiweifs	12,79 „	9,68 „
Albumin	4,03 „	4,19 „
Globulin	1,79 „	0,93 „
Stroma	6,97 „	4,59 „

Wenn man die Menge der betreffenden Eiweifsfraktionen bei hungernden Tieren gleich eins setzt, so erhält man für die gemästeten Tiere folgende Zahlen:

	Gemästete Tiere	Hungernde Tiere
Albumin	0,96	1
Globulin	1,92	1
Stroma	1,53	1

Man sieht daraus, dafs bei gemästeten Tieren die Menge der unlöslichen Stromabestandteile und der Globuline vergröfsert ist. Durch den erhöhten Vorrat an diesen Eiweifskörpern dürfte aber die Leber nach dem Gesagten ein erhöhtes Bindungsvermögen für Gifte gewinnen.

Litteratur.

[1]) Roger, Arch. de physiol. **24**, 24.

[2]) Heger, Expériences sur la circulation du sang. Thèse d'aggrégation. Bruxelles 1873.

[3]) Lautenbach, Philadelph. med. Times 1877.

[4]) Jacques, Essai sur la localisation des alcaloides dans le foie. Thèse. Bruxelles 1880.

[5]) Gley, Compt. rend. de la Soc. Biol. 1891.

[6]) Blum, Zeitschr. für physiol. Chemie **26**, 160.

[7]) Oswald, Ebenda **32**, 133.

[8]) Gautier, Compt. rend. de l'Académie des Sc. 1899.

[9]) Stassano, Compt. rend. de l'Académie des Sc. 1900, p. 131.

[10]) Halliburton, Lehrbuch der chemischen Physiologie.

[11]) Oidtmann, Die anorganischen Bestandteile der Leber. Würzburg 1858.

[12]) Plósz und Györgyai, Pflügers Arch. **7**, 371.

[13]) Halliburton, Proceed. of the phys. Society 1890.

[14]) Gautier, Compt. rend. de l'Académie des Sc. 1899, **129**, 936.

[15]) Iljin, Myosin und Myostromin. Russ. Dissert. 1900.

[16]) Umikoff, Physiologie der Eiweifsablagerung im Tierkörper. Recueil physiol. de Danilevski. Russ.

XIX.

Zur Kenntnis der Einwirkung der Enzyme aufeinander*).

Von A. Wróblewski, B. Bednarski und M. Wojczyński.

Einleitung.

Die Einwirkung der Enzyme aufeinander ist seit langer Zeit Gegenstand der Untersuchung. Corvisart hat bereits gelehrt, dafs Pepsin und Trypsin sich gegenseitig vernichten. Dagegen giebt Kühne um 1876 an, dafs Trypsin vom Pepsin verdaut wird, die umgekehrte Wirkung aber nicht zu stande kommt**). Ewald bestätigte 1880 diese Beobachtungen; er hatte bei den Pepsinversuchen eine 3proz. Salzsäure angewendet***). Engesser dagegen, dessen Pankreatinpräparate von Ewald benutzt worden waren, bezweifelte diese Beobachtungen und giebt an, dafs das Pankreatin seine Wirkung durch Pepsin selbst in 0,5 proz. Salzsäure nicht verliert†). Aus den Untersuchungen von R. Mays folgt, dafs das Pepsin die schädigende Wirkung schwacher Säuren auf das Trypsin unterstützt††). Langley giebt dagegen den Beobachtungen Kühnes gegenüber an, dafs das Trypsin auf das Pepsin einwirkt, indem es die abschwächende Wirkung des Alkalis unterstützt. Das Lab soll nach ihm vom Trypsin verdaut werden, das Pepsin auf Diastase abschwächend†††) wirken.

Nach F. Falk wirken Speichel, Pankreassaft und Papain auf Ptyalin und Diastase nicht ein. Den Angaben desselben Autors

*) Die hier mitgeteilten Untersuchungen sind 1896 im physiologischen Institute der Jagellonischen Universität begonnen und 1901 in der k k. allg. Untersuchungsanstalt f. Lebensmittel in Krakau beendigt worden.

**) Jahresber. f. d. Tierchemie 1876.

***) Daselbst 1880, S. 297.

†) Daselbst.

††) Daselbst, S. 298.

†††) Daselbst 1881, S. 295.

nach ist auch Pepsin auf Invertin ohne Einfluſs. Dasselbe wurde von Ch. Richet und Szabó beobachtet. Falk konnte auch keine Einwirkung von Trypsin auf Invertin wahrnehmen*). Nach Beobachtungen von Marcus und Pinet beeinträchtigen Speichel und Pankreassaft die Emulsinwirkung nicht, dagegen aber 0,02 proz. Salzsäure; Papain bleibt ohne Wirkung auf die Diastase und auf Ptyalin**). Nach A. Baginsky wird Lab durch Trypsin zerstört, das Trypsin koaguliert die Milch nicht, Pepsin zerstört Trypsin***). Nach Angaben von C. Fermi und L. Pernossi dagegen wirkt Pepsin auf Trypsin nicht ein†).

Die vorstehende Zusammenstellung weist eine solche Verschiedenheit der Ansichten in der aufgeworfenen Frage auf, daſs sich daraus keine klaren und sicheren Schlüsse ziehen lassen. Es schien uns demnach notwendig, in dieser Richtung neue Untersuchungen anzustellen.

1. Über die Einwirkung des Pepsins auf das Trypsin.

Um die Art der Einwirkung des Pepsins auf das Trypsin sicherzustellen, muſsten wir zuerst die Empfindlichkeit des Trypsins gegen die Wirkung der Salzsäure und gegen die Wirkung der salzsauren Lösung des Pepsins kennen lernen.

Wir haben ein aus dem Schweinpankreas frisch bereitetes Trypsinpräparat und ein käufliches Pepsinpräparat angewendet. Parallel angestellte Proben haben ergeben, daſs durch dieses Trypsin Fibrin leichter als koaguliertes Eiweiſs verdaut wird. Die Wirkung kleiner Salzsäuremengen auf dieses Trypsin ist aus den in Tabelle I angegebenen Resultaten von drei Versuchsreihen ersichtlich.

Die einer Reihe angehörigen Proben wurden parallel untersucht. Alle Probierröhrchen waren mit einer Lösung von 0,05 g Trypsin in 3 ccm 0,1 proz. Sodalösung beschickt. Sie wurden mit Salzsäure neutralisiert, dann mit so viel Salzsäure versetzt, als der Gehalt an derselben in den Zahlen der Tabelle I anzeigt. Alle Proben wurden sodann im Ostwaldschen Thermostaten bei 37° sechs Stunden lang stehen gelassen. Darauf wurden alle

*) Jahresber. f. d. Tierchemie 1881, S. 444 u. 1882, S. 496.

**) Daselbst 1883, S. 416.

***) Daselbst.

†) Daselbst 1894, S. 723. — Diese kurze Zusammenstellung der Ansichten der Untersucher über die im Titel aufgeworfene Frage ist nicht vollständig, weil hier die bei der Bearbeitung anderer Fragen gemachten, gelegentlichen Beobachtungen der Forscher nicht berücksichtigt sind.

Proben mit Soda neutralisiert, mit so viel Wasser versetzt, dafs das Volumen einer jeden Probe 16,8 ccm betrug. Aus einer jeden Probe wurden 5 ccm in ein neues Glas gebracht, mit 5 ccm 0,2 proz. Sodalösung und mit annähernd 1 ccm von gequollenem, nach Grützner mit Karmin gefärbtem Fibrin versetzt. Nach dem Einsetzen der Röhrchen in den Thermostaten wurde von Zeit zu Zeit der Gang der Verdauung beobachtet (Tabelle I).

Aus den Ergebnissen dieser Versuche folgt, dafs Salzsäure das Trypsin angreift. Kleine Salzsäuremengen, bis 0,14 Proz. HCl wirken schwach, 0,56 Proz. HCl wirken schon sehr stark störend, heben unter gewissen Umständen die tryptische Wirkung vollständig auf. Die in den angeführten drei Versuchsreihen auftretenden Unterschiede rühren wahrscheinlich daher, dafs die Trypsinlösungen nicht gleich frisch bereitet und deshalb nicht von gleicher Wirksamkeit waren.

Eine weitere Versuchsreihe wurde mit einem sehr reinen, von uns dargestellten, bei 105° getrockneten und gepulverten Fibrin angestellt.

In vier Probiergläschen wurde je 0,05 g durchgesiebtes Fibrinpulver und 0,33 ccm 6 proz. Sodalösung hineingethan und 4½ Stunden im Ostwaldschen Thermostaten bei 37° C. digeriert. Dann wurde das unverdaut gebliebene Fibrin auf gewogenen Filtern gesammelt, mit Wasser, Alkohol, Äther gewaschen, bei 105° getrocknet (Tabelle II).

Diese Versuche haben uns weniger befriedigt als diejenigen mit dem gequollenen Fibrin, weil das Fibrinpulver nicht gleichmäfsig quillt und nicht gleichmäfsig verdaut wird.

Um zu genaueren Resultaten zu gelangen, wurde von uns eine Hühnereiweifslösung in Verdünnung 1 : 4 als Verdauungsobjekt angewendet. Die Versuche, deren Resultate in der Tabelle III angeführt sind, waren auf ähnliche Weise wie die vorigen angestellt, mit dem Unterschiede, dafs je 5 ccm einer jeden neutralisierten Flüssigkeit nicht mit Fibrin, sondern mit 3 ccm der erwähnten Eiweifslösung und 0,33 ccm 6 proz. Sodalösung versetzt wurden. Nach sechsstündigem Digerieren im Thermostaten wurden alle Proben mit genügender Menge 10 proz. Essigsäure versetzt, aufgekocht und das unverdaute Eiweifs gewichtsanalytisch bestimmt.

Die Resultate der Tabellen II und III stimmen im allgemeinen mit denjenigen der Tabelle I überein.

Nach diesen Vorversuchen wurde zur Untersuchung der Einwirkung des Pepsins auf Trypsin geschritten.

In den Tabellen IV und V sind die Resultate dieser Versuche zusammengestellt. Tabelle IV bezieht sich auf gequollenes Fibrin und Tabelle V auf Eiweifslösung als Verdauungsobjekt.

Tabelle I.

Nummer der Probe	HCl Proz.	Zustand des in Verdauung begriffenen Fibrins nach								
		1 Stunde	2 Stunden	2½ Stunden	3 Stunden	4 Stunden	5 Stunden	6 Stunden	7 Stunden	8 Stunden
Reihe I 1	0,028	—	Beginn der Verdauung	Der gröfsere Teil unverdaut	½ unverdaut	Wenig unverdaut	Spuren unverdaut	Spuren	Es bildet sich ein kleiner Niederschlag	
Reihe I 2	0,056	—								
Reihe I 3	0,084	—								
Reihe I 4	0,112	—								
Reihe I 5	0,140	—								
Reihe I 6	0,280	—	—	—	Beginn der Verdauung	½ unverdaut	Wenig unverdaut	Spuren unverdaut	Spuren	Es bildet sich ein kleiner Niederschlag
Reihe I 7	0,560	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Reihe I 8	0,000	Beginn der Verdauung	½ unverdaut	Weniger als ½ unverdaut	Wenig unverdaut	Spuren unverdaut	Spuren	Es bildet sich ein kleiner Niederschlag		
Reihe II 1	0,112	—	—	—	Beginn der Verdauung	½ unverdaut	⅓ unverdaut	¼ unverdaut	Wenig unverdaut	Spuren unverdaut
Reihe II 2	0,140	—	—	—	Beginn der Verdauung	½ „	⅔ „	¼ „	Wenig unverdaut	Sehr wenig unverdaut
Reihe II 3	0,280	—	—	—	—	Beginn der Verdauung	½ „	⅓ „	¼ unverdaut	¼ unverdaut
Reihe II 4	0,560	—	—	—	—	—	Beginn der Verdauung	⅔ „	½ „	⅓ „
Reihe II 5	0,700	—	—	—	—	—	—	Beginn der Verdauung	⅔ „	½ „
Reihe II 6	0,000	Beginn der Verdauung	½ unverdaut	Spuren unverdaut	Spuren	Es entsteht ein kleiner Niederschlag				
Reihe III 1	0,056	—	½ unverdaut	⅓ unverdaut	¼ unverdaut	Wenig unverdaut	Spuren unverdaut	Spuren	Es entsteht ein kleiner Niederschlag	
Reihe III 2	0,112	—	—	Beginn der Verdauung	½ „	¼ unverdaut	⅓ unverdaut	Wenig unverdaut	Spuren	Spuren
Reihe III 3	0,280	—	—	—	¾ „	⅔ „	½ „	Weniger als ½ unverdaut	Wenig unverdaut	Spuren
Reihe III 4	0,560	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Reihe III 5	0,980	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Reihe III 6	1,400	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Reihe III 7	0,000	Beginn der Verdauung	¼ unverdaut	Wenig unverdaut	Spuren unverdaut	Spuren	Spuren	Es entsteht ein kleiner Niederschlag		

Tabelle II.

Nummer der Probe	HCl Proz.	Gewicht des unverdauten Fibrins g
1	0,028	0,0005
2	0,560	0,0440
3	0,980	0,0456
4	0,000	0,0031

Tabelle III.

Nummer der Probe	Trypsinlösung ccm	HCl Proz.	Gewicht des unverdauten Eiweifses g
1	3	0,028	0,0548
2	3	0,980	0,0690
3	3	0,000	0,0537
4	0	0,000	0,0698

Tabelle IV.

Nummer der Probe	2 proz. Trypsinlösung ccm	HCl Proz.	2 proz. Pepsinlösung ccm	Zustand des in Verdauung begriffenen Fibrins nach								
				3 Stunden	4 Stunden	5 Stunden	6 Stunden	19 Stunden	20 Stunden	23 Stunden	26 Stunden	29 Stunden
1	3	0,056	2,66	—	—	—	—	Beginn der Verdauung	¾ unverdaut	½ unverdaut	⅓ unverdaut	Wenig unverdaut
2	3	0,112	2,66	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	3	0,168	2,66	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	3	0,224	2,66	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	3	0,056	0,00	Beginn der Verdauung	¼ unverdaut	Wenig unverdaut	Wenig unverdaut			Alles verdaut		
6	3	0,112	0,00	—	—	Beginn der Verdauung	½ unverdaut	Wenig unverdaut	Spuren unverdaut	Alles verdaut		
7	3	0,168	0,00	—	—	—	—	¼ unverdaut	⅕ unverdaut	⅙ unverdaut	Wenig unverdaut	Alles verdaut
8	3	0,224	0,00	—	—	—	—	¼ „	⅕ „	⅙ „	Wenig unverdaut	„ „
9	3	0,280	0,00	—	—	—	—	¼ „	⅕ „	⅙ „	Wenig unverdaut	„ „
10	3	0,560	0,00	—	—	—	—	½ „	¼ „	Wenig unverdaut	Spuren unverdaut	„ „
11	3	1,120	0,00	—	—	—	—	Beginn der Verdauung	Beginn der Verdauung	¾ unverdaut	¾ unverdaut	½ unverdaut
12	3	0,000	0,00	Wenig unverdaut				Alles verdaut				
13	0	0,000	0,00	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tabelle V.

Nummer der Probe		2 proz. Trypsinlösung ccm	HCl Proz.	Pepsin g	Eiweifslösung (1 : 5) ccm	Gewicht des unverdauten Eiweifses g
Reihe I	1	10	0,056	0,1078	3	0,0185
	2	10	1,120	0,1078	3	0,0761
	3	10	0,056	0,0000	3	0,0230
	4	10	1,120	0,0000	3	0,0480
	5	10	0,000	0,0000	3	0,0000
	6	0	0,000	0,0000	3	0,1025
Reihe II	1	10	0,056	0,1078	3	0,0207
	2	10	0,280	0,1078	3	0,0392
	3	10	1,120	0,1078	3	0,0401
	4	10	0,056	0,0000	3	0,0131
	5	10	0,280	0,0000	3	0,0372
	6	10	1,120	0,0000	3	0,0386
	7	10	0,000	0,0000	3	0,0272
Reihe III	1	3	0,028	0,1078	3	0,0230
	2	3	0,560	0,1078	3	0,0299
	3	3	0,980	0,1078	3	0,0457
	4	3	0,000	0,0000	3	0,0087
	5	0	0,000	0,0000	3	0,1102

Die Versuche wurden derart angestellt, dafs nach dem Versetzen der Trypsinlösung mit Salzsäure und Pepsin alle Proben im Thermostaten sechs Stunden lang digeriert, nachher neutralisiert, mit Wasser auf das gleiche Volumen gebracht, mit Soda bis zum Gehalte von 0,1 Proz. alkalisiert, dann mit Fibrin resp. mit Eiweifslösung versetzt wurden.

Aus diesen Versuchen folgt, dafs das Pepsin auf Trypsin einwirkt, obgleich nicht so stark, dafs es das Trypsin in kurzer Zeit vollständig verdauen könnte, es unterstützt aber die schädigende Wirkung der Säuren.

2. Über die Wirkung des Trypsins auf das Pepsin.

Unsere Versuche über die Wirkung des Trypsins auf das Pepsin sind auf folgende Weise angestellt worden:

Acht Probiergläschen wurden mit je 5 ccm 2 proz. Pepsinlösung und so viel Natronlauge versetzt, wie die Zahlen der Tabelle VI angeben, dann 5 ccm 2 proz. Trypsinlösung und zwar in den Proben 1 bis 4 von einer vorher gekochten Lösung und in den Proben 6 bis 9 der ungekochten Lösung, dann Wasser bis zum Volumen von 13 ccm zugefügt. Nach sechsstündigem Digerieren im Thermostaten wurden die Proben mit Salzsäure neutralisiert und alle Proben mit Wasser auf 15 ccm gebracht. Dann wurde eine ganz

frische Lösung von 0,1 g Pepsin in 15 ccm Wasser für die Probe 5 hergestellt. Aus jeder dieser 9 Proben wurden 10 ccm in ein Probiergläschen übergegossen, mit 5 ccm einer Lösung von Hühnereiweifs in 0,2 proz. Salzsäure versetzt und sechs Stunden im Thermostaten digeriert. Die Menge des unverdauten Eiweifses wurde gewichtsanalytisch bestimmt. Die Kontrollprobe 10 enthielt nur 5 ccm der Eiweifslösung.

Tabelle VI.

Nummer der Probe	2 proz. Pepsinlösung ccm	NaOH Proz.	2 proz. Trypsinlösung ccm		Eiweifslös. in 2 proz. Salzsäure ccm	Gewicht des unverdauten Eiweifses g
1	5	0,00	gekocht	5	5	0,1070
2	5	0,01	„	5	5	0,1308
3	5	0,05	„	5	5	0,1400
4	5	0,10	„	5	5	0,1430
5	5	0,00	„	5	5	0,0699
6	5	0,00	ungekocht	5	5	0,1410
7	5	0,01	„	5	5	0,1525
8	5	0,05	„	5	5	0,1455
9	5	0,10	„	5	5	0,1498
10	0	0,00		0	5	0,1395

Es folgt aus den in Tabelle VI vorliegenden Resultaten, dafs 0,05 Proz. und 0,10 Proz. NaOH das Pepsin zerstören, 0,01 Proz. dessen Wirkung bedeutend schwächt, der Zusatz von frischem Trypsin noch bedeutendere Schwächung bewirkt. Aber auch ohne Natronlauge wirkt eine frische Trypsinlösung auf das Pepsin ein, wie es aus dem Vergleiche der Versuche 1 und 6 folgt.

Das zu grofse Gewicht des Eiweifses in den Proben 7, 8 und 9 rührt daher, dafs die Trypsinlösung koagulierende Eiweifsstoffe enthält, welche mit dem Hühnereiweifs zusammen gewogen wurden. In den Proben 1 bis 4 wurden dagegen die nach dem Aufkochen filtrierten Trypsinlösungen zugesetzt. Der Vergleich der Proben 1 und 5 beweist, dafs das Pepsin schon durch die Wirkung des Wassers geschwächt wurde.

Es folgt aus diesen Versuchen, dafs das Pepsin unter der Wirkung des Trypsins geschwächt wird. Das Trypsin unterstützt ferner die zerstörende Wirkung des Alkalis.

3. Über die Wirkung der proteolytischen Fermente auf das Labferment.

Bei der Untersuchung der Wirkung des Pepsins und des Trypsins auf das Labferment wurde eine 1 proz. Lösung der Hansenschen Käselabtabletten angewendet.

In 11 Probiergläschen wurde je 1 ccm Lablösung eingegossen, dann Säure resp. Lauge zugesetzt, in allen Proben mit Wasser auf 3 ccm aufgefüllt. In drei andere Probiergläschen wurden je 3 ccm Wasser eingebracht. Dann wurde zu einer Anzahl Proben je 1 ccm von gekochter resp. von ungekochter Trypsinlösung, zu der anderen von gekochter resp. ungekochter Pepsinlösung hinzugefügt, wie aus Tabelle VII ersichtlich ist. Sodann wurden alle Proben mit Wasser auf 4 ccm gebracht und im Ostwaldschen Thermostaten bei 37° C. 10 Stunden digeriert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden sie neutralisiert, bis zum Volumen von 5 ccm mit Wasser aufgefüllt, mit je 10 ccm frischer Milch gemischt und auf 37°C. gebracht. In der letzten Kolonne der Tabelle VII ist die Zeit angegeben, welche von dem Momente des Vermischens mit Milch bis zum Momente der beginnenden Koagulierung verflossen ist.

Tabelle VII.

	Nr. der Probe	1 proz. Lablösung ccm	KOH Proz.	HCl Proz.	2 proz. Pepsinlösung ccm	2 proz. Trypsinlösung ccm	Nach wie viel Minuten trat die Gerinnung ein?
Reihe I	1	1	0,00	0,03	gekocht 1	0	3
	2	1	0,00	0,10	„ 1	0	3,5
	3	1	0,00	0,30	„ 1	0	3,5
	4	1	0,01	0,00	0	ungekocht 1	13
	5	1	0,05	0,00	0	„ 1	14
	6	1	0,10	0,00	0	„ 1	20,5
	7	1	0,00	0,03	ungekocht 1	0	2,5
	8	1	0,00	0,10	„ 1	0	3
	9	1	0,00	0,30	„ 1	0	3
	10	1	0,00	0,00	0	ungekocht 1	11
	11	1	0,00	0,00	ungekocht 1	0	36,5
	12	0	0,00	0,00	„ 1	0	360
	13	0	0,00	0,00	0	ungekocht 1	26
	14	0	0,00	0,00	0	0	360
Reihe II	1	1	—	—	gekocht 0,5	gekocht 0,5	2
	2	1	—	—	0	ungekocht 1	20
	3	1	—	—	0	0	3
	4	0	—	—	ungekocht 1	0	180
	5	0	—	—	0	ungekocht 1	43
Reihe III	1	1	—	—	ungekocht 1	—	2,5
	2	1	—	—	0	—	2

Aus dieser Versuchsreihe folgt vor allem, dafs das Trypsin schon an sich die Milch koaguliert wie Lab. Diese Beobachtung wird durch die zweite Versuchsreihe derselben Tabelle bestätigt. Wir haben uns überzeugt, dafs auch andere Trypsinpräparate, unter denen eins von einem von uns aus Schweinspankreas dargestellt war, auf ähnliche Weise wirkten. Es hat sich weiter ergeben, dafs

auch der aus dem Schweinspankreas ausgepreſste Saft dem Labfermente gleich auf die Milch einwirkt. Das Vorhandensein eines Labenzyms im Pankreassafte wurde schon von Kühne und W. Roberts beobachtet und jetzt von uns bestätigt.

Es ist aus der ersten Reihe der Tabelle VII ersichtlich, daſs das Labferment durch Pepsin nicht zerstört wird, was auch die Reihe III bestätigt.

4. Über die Wirkung der Enzyme auf das Invertin.

Bei der Ausführung der hier beschriebenen Untersuchungen wurde eine 2 proz. Lösung von Rohinvertin angewendet. Dasselbe war von einem von uns aus Hefepreſssaft dargestellt. Der Hefepreſssaft wurde mit dem halben Volumen Alkohol gefällt, das Filtrat wieder mit dem anderthalbfachen Volumen Alkohol, auf das ursprüngliche Volumen des Saftes berechnet, gefällt. Der auf diese Weise erhaltene, ausgewaschene und getrocknete Niederschlag stellte das hier angewendete Rohinvertin dar*).

Im ganzen wurden 17 Proben angestellt. In 14 Probiergläschen wurde je $^1/_2$ ccm Invertinlösung eingebracht, in das Gläschen 3 dann $^1/_2$ ccm gekochte Pepsinlösung, in die Gläschen 5, 12, 13 und 14 dagegen ebenso viel frische Pepsinlösung. Auf ähnliche Weise wurde mit Trypsinlösung in Bezug auf die Proben 2, 4, 10, 11 und 15 vorgegangen. Einige Proben wurden, wie aus Tabelle VIII zu ersehen, mit Natronlauge, Salzsäure, Diastaselösung versetzt und die gesamten Proben in den Ostwaldschen Thermostaten gestellt. Während neun Stunden verblieb das Invertin unter der Wirkung dieser Reagentien. Sodann wurde die invertierende Kraft aller Proben mit Hilfe einer von einem von uns zu diesem Zwecke angegebenen Methode bestimmt**).

Das Volumen jeder Probe wurde mit Wasser auf 2 ccm gebracht, dazu je 18 ccm 4% proz. Rohrzuckerlösung zugesetzt. Nach einstündigem Digerieren im Thermostaten wurden die Proben aufgekocht, nach dem Erkalten bis zum Volumen von 20 ccm mit Wasser aufgefüllt und im Polarisationsapparate bei einer Temperatur von 20° C. untersucht. Im Falle der totalen Inversion muſsten wir eine Drehung von $-4{,}2°$ (d. h. Grade der geradlinigen Skala des Halbschattenapparates von Schmidt und Haensch) erhalten. Dagegen drehte die nicht invertierte Rohrzuckerlösung $+15{,}2°$. Die beobachteten Drehungswinkel sind in der letzten Spalte der Tabelle VIII angegeben.

Aus diesen Beobachtungen folgt vor allem, daſs die Invertinwirkung unter dem Einflusse von gekochter und frischer Pepsin-, Trypsin- und Diastaselösung verstärkt wird; es kommt dies wahr-

*) Abhandl. der Akad. d. Wiss. in Krakau 41, 102.
**) Daselbst S. 101.

Tabelle VIII.

Nr. der Probe	2 proz. Invertin-lösung ccm	NaOH Proz.	HCl Proz.	2 proz. Pepsin-lösung ccm	2 proz. Trypsin-lösung ccm	2 proz. Diastase-lösung ccm	Polarisations-winkel α_s
1	0,5	0	0	0	0	0	+ 0,7°
2	0,5	0	0	0	gekocht 0,5	0	— 4,4°
3	0,5	0	0	gekocht 0,5	0	0	— 3,6°
4	0,5	0	0	0	ungek. 0,5	0	— 3,3°
5	0,5	0	0	ungek. 0,5	0	0	— 3,4°
6	0,5	0,025	0	0	0	0	+ 9,6°
7	0,5	0,050	0	0	0	0	+ 15,2°
8	0,5	0	0,018	0	0	0	+ 8,8°
9	0,5	0	0,035	0	0	0	+ 12,6°
10	0,5	0,025	0	0	ungek. 0,5	0	— 1,4°
11	0,5	0,050	0	0	„ 0,5	0	— 3,8°
12	0,5	0	0,018	ungek. 0,5	0	0	— 2,8°
13	0,5	0	0,035	„ 0,5	0	0	+ 12,6°
14	0	0	0	„ 0,5	0	0	+ 15,2°
15	0	0	0	0	ungek. 0,5	0	+ 15,3°
16	0,5	0	0	0	0	ungek. 0,5	— 2,4°
17	0	0	0	0	0	„ 0,5	+ 15,2°

scheinlich daher, dafs diese Enzympräparate bedeutende Mengen von Phosphaten enthalten, welche auf die Inversion befördernd einwirken. Es ist weiter klar, dafs weder Pepsin noch Trypsin noch Diastase das Invertin schädigen. Die früher von einem von uns gemachten Beobachtungen, dafs weder das Trypsin noch das proteolytische Ferment des Hefepreſssaftes auf das Invertin einwirken, wurde auf diese Weise in Bezug auf das Trypsin bestätigt*). Wir ersehen auch, dafs der Zusatz von Lauge resp. Säure die Invertinwirkung schwächt. Falls die Lauge, resp. die Säure mit dem Trypsin, resp. Pepsin zusammen zugesetzt worden sind, so wird ihre schwächende Wirkung teilweise oder vollständig aufgehoben, wahrscheinlich weil die Säure oder das Alkali durch diese Präparate gebunden werden.

5. Über die Wirkung der Enzyme auf die Diastase.

Wir haben bei diesen Versuchen eine 2 proz. Lösung von Rohdiastase angewendet, welche von einem von uns aus dem Malze dargestellt worden war**).

*) Abhandl. der Akad. d. Wiss. in Krakau 41, 116.
**) Zeitschr. f. physiol. Chemie 24, 180.

In 13 Probiergläschen wurde je 1 ccm dieser Lösung eingefüllt; einzelne von diesen Proben wurden mit Natronlauge resp. Salzsäure versetzt, wie aus Tabelle IX ersichtlich ist. Dann wurden bestimmte Proben mit der frischen resp. gekochten Pepsin-, Trypsin- resp. Invertinlösung versetzt, alle Proben mit Wasser bis zum Volumen von 2 ccm aufgefüllt und im Thermostaten neun Stunden digeriert. Sodann wurden die Lösungen sämtlich mit Wasser auf 5 ccm aufgefüllt und ihre diastatische Wirkung mit Hilfe einer von einem von uns angegebenen Methode bestimmt*). Eine jede Probe wurde mit 50 ccm einer 2proz. Lösung von löslicher Stärke versetzt und $8^1/_2$ Stunden bei 37° im Thermostaten digeriert. Nach dem Aufkochen wurde die reduzierende Wirkung der Proben mit Fehlingscher Lösung bestimmt. Das Gewicht des reduzierten Kupfers diente als Mafs für die diastatische Wirkung.

Tabelle IX.

	Nr. der Probe	2proz. Diastaselösung ccm	NaOH Proz.	HCl Proz.	2proz. Trypsinlösung ccm	2proz. Pepsinlösung ccm	2proz. Invertinlösung ccm	Das Gewicht d. reduziert. Kupfers in g
Reihe I	1	1	0	0	0	0	0	0,2854
	2	1	0,03	0	0	0	0	0,1945
	3	1	0,10	0	0	0	0	0,0010
	4	1	0	0,009	0	0	0	0,0121
	5	1	0	0,020	0	0	0	0,0089
	6	1	0,03	0	ungek. 0,5	0	0	0,1511
	7	1	0,10	0	ungek. 0,5	0	0	0,0288
	8	1	0	0	0	ungek. 0,5	0	0,1836
	9	1	0	0,009	0	„ 0,5	0	0,0074
	10	1	0	0,020	0	„ 0,5	0	0,0064
	11	1	0	0	gekocht 0,5	0	0	0,2112
	12	1	0	0	0	0	ungek. 0,5	0,3108
	13	1	0	0	0	0	gekocht 0,5	0,3134
Reihe II	1	1**)	—	0	—	0	—	0,2012
	2	1	—	0	—	ungek. 0,5	—	0,1997
	3	1	—	0,009	—	0	—	0,1961
	4	0	—	0	—	0	—	Spuren
	5	0	—	0,009	—	0	—	„

Aus diesen Versuchen ersehen wir, dafs das Trypsin auf die Diastase nicht einwirkt, wohl aber das Pepsin, welches ihre Wirksamkeit etwas herabsetzt und die schädliche Wirkung der Säuren verstärkt. Die frische wie auch die gekochte Invertinlösung wirken schwach befördernd, wahrscheinlich weil das Invertinpräparat

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 24, 199.

**) In Reihe II kam eine andere Diastaselösung zur Verwendung.

bedeutende Mengen von Phosphaten enthält, deren Anwesenheit die Enzymwirkungen steigert.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche bestätigen die vorläufige Beobachtung des einen von uns, dafs das Trypsin auf die Diastase ohne Wirkung ist, und sprechen nicht gegen die Beobachtung, dafs das Pepsin in einer schwach sauren Lösung im Laufe von 48 Stunden bei 40° C. die Diastase zerstört*), da sie zeigen, dafs die Diastase durch Pepsin bei einer niedrigeren Temperatur und in viel kürzerer Zeit merklich geschwächt wird.

6. Über die Wirkung der proteolytischen Fermente auf das Emulsin.

Das bei den Versuchen angewandte Emulsinpräparat wurde aus dem wässerigen Auszuge der entölten bittern Mandeln, nach dem Entfernen des Legumins, durch Fällung mit $1^1/_2$ Volumen Alkohol erhalten. Dieses Präparat gab ausgesprochene Reaktionen der Proteinstoffe, reduzierte Fehlingsche Lösung auch nach dem Aufkochen mit Salzsäure nicht und enthielt ziemliche Mengen von Phosphaten alkalischer Erden.

Tabelle X.

	Nummer der Probe	2 proz. Emulsinlösung ccm	NaOH Proz.	HCl Proz.	2 proz. Trypsinlösung ccm	2 proz. Pepsinlösung ccm	Polarisation $\alpha =$
Reihe I	1	1	0	0	0	0	— 2,0°
	2	1	0	0	0,5	0	— 2,0°
	3	1	0,033	0	0,5	0	— 5,4°
	4	1	0,033	0	0	0	— 4,5°
	5	1	0	0	0	0,5	— 1,2°
	6	1	0	0,005	0	0,5	— 3,4°
	7	1	0	0,005	0	0	— 2,9°
Reihe II	1	1	0	0	0	0	+ 5,4°
	2	1	0	0	0,5	0	+ 5,2°
	3	1	0,016	0	0,5	0	+ 5,0°
	4	1	0,016	0	0	0	+ 5,2°
	5	1	0	0,003	0	0,5	+ 5,7°
	6	1	0	0,003	0	0	+ 5,1°
	7	0	0	0	0	0	— 12,8°

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 24, 210.

Sieben Probiergläschen wurden mit je 1 ccm 2proz. Lösung vom erwähnten Rohemulsin beschickt. Eine Anzahl Proben wurde mit Lauge resp. Säure, Pepsin- resp. Trypsinlösung, wie es aus der Tabelle X ersichtlich ist, versetzt. Dann wurden alle Proben mit Wasser zum gleichen Volumen aufgefüllt und im Thermostaten während 10 Stunden digeriert, alsdann neutralisiert und wieder mit Wasser bis zum Volumen von 3 ccm aufgefüllt. Dann wurde in den Proben die enzymotische Kraft des Emulsins folgenderweise bestimmt. Jede Probe wurde mit 10 ccm 10proz. Salizinlösung versetzt und im Thermostaten während drei Stunden digeriert. Die Polarisation wurde in einem 100 mm-Rohr bestimmt.

In ähnlicher Weise wurde die zweite Versuchsreihe angestellt; nur mit dem Unterschiede, dafs die Proben im Thermostaten acht Stunden digeriert wurden, und dafs der Drehungswinkel bei der Anwendung eines 200 mm-Rohres bestimmt wurde.

Die angeführten Versuche beweisen, dafs weder das Trypsin noch das Pepsin auf das Emulsin einwirken.

Anhang.

Bei Gelegenheit der mit dem Emulsin vorgenommenen Versuche haben wir unsere Aufmerksamkeit auf einige seiner Eigenschaften gelenkt. Die diesbezüglichen Untersuchungen sind im Folgenden beschrieben.

4,0660 g Rohemulsin wurden mit 406 ccm Wasser verrieben und von dem ungelösten Teile abfiltriert. Es wurde der Rückstand A und das Filtrat B erhalten. Das Filtrat wurde mit schwefelsaurem Ammonium ausgesalzen. Dabei erhielten wir den Niederschlag C und das Filtrat D. Sodann haben wir die fermentive Kraft des Rückstandes A und der Filtrate B und D auf folgende Weise bestimmt. Drei Probiergläschen wurden mit je 18 ccm einer $4^4/_9$proz. Salizinlösung beschickt. Der Rückstand A wurde in 400 ccm mit Alkali versetztem Wasser gelöst, 1 ccm von dieser Lösung in eines der drei Probiergläschen eingebracht. Die zwei anderen wurden mit je 1 ccm von den Filtraten B und D beschickt und alle drei Proben auf 20 ccm mit Wasser aufgefüllt und in den Thermostaten gestellt. Nach dem Verlaufe von einer Stunde und von 11 Stunden wurde die Polarisation der Proben zweimal bestimmt.

Die dabei erhaltenen Daten sind in der Tabelle XI zusammengestellt. Wir fügen noch hinzu, dafs als die der vollständigen Spaltung entsprechende Zahl + 5,4° — Polarisation der Probe 3 nach 19 Stunden — anzusehen ist.

Der Niederschlag C wurde im Wasser gelöst und dialysiert.

Dabei entstand kein Niederschlag. Die Innenflüssigkeit des Dialysators besafs starke Fermentwirkung.

Aus diesem Versuche ist zu ersehen, dafs das Emulsin durch schwefelsaures Ammon aussalzbar ist.

Tabelle XI.

Nr. der Probe		Polarisation α	
		nach der ersten Stunde	nach der elften Stunde
1	18 ccm Salizinlösung + 1 ccm von der Lösung des Rückstandes A	— 13,7°	— 12,7°
2	18 ccm Salizinlösung + 1 ccm des Filtrates D	— 13,8°	— 13,4°
3	18 „ „ + 1 „ „ „ B	— 9,2°	+ 4,7°
4	18 „ „ + 1 „ Wasser . . .	— 13,9°	—

Es war weiter interessant, zu prüfen, ob das Emulsin, wie es Emil Fischer angiebt, den Milchzucker spaltet*), da wir dies bezweifelnde Bemerkungen in der Litteratur angetroffen haben**). Wir haben unsere Versuche darauf gegründet, dafs der Milchzucker schwächer als seine Spaltungsproducte die Fehlingsche Lösung reduziert.

Vier Probiergläschen wurden mit je $4^4/_9$ proz. Milchzuckerlösung beschickt; zwie von diesen Proben wurden mit je 2 ccm Wasser,

Tabelle XII.

	Nummer der Probe	2 proz. Emulsinlösung ccm	H_2O ccm	Gewicht des reduzierten Kupfers g
Reihe I	1	2	0	0,2516
	2	2	0	0,2529
	3	0	2	0,2403
	4	0	2	0,2422
Reihe II	1	2	0	0,2788
	2	2	0	0,2790
	3	0	2	0,1853
	4	0	2	0,1875

*) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 28, 1432.

**) Ducleaux, Microbiologie, t. II, p. 35, „d'après Fischer l'émulsine dédoublerait le sucre de lait . . . . . mais cela reste douteux“.

die zwei anderen mit je 2 ccm 2proz. Emulsinlösung versetzt und im Thermostaten während 12 Stunden digeriert. Alsdann wurden aus jeder Probe 5 ccm Flüssigkeit entnommen, mit 40 ccm Fehlingscher Lösung gekocht und das Gewicht des dabei erhaltenen reduzierten Kupfers bestimmt. Es ist aus der Tabelle XII ersichtlich, dafs die das Emulsin enthaltenden Lösungen stärker reduzieren, was die Angabe von Emil Fischer bestätigt.

Schlufsfolgerungen.

Die Resultate unserer Versuche sind die folgenden:

1. Pepsin schädigt Trypsin, indem es die zerstörende Wirkung der Säuren unterstützt.

2. Trypsin wirkt auf Pepsin schwächend ein. Es unterstützt ferner die zerstörende Wirkung der Alkalien.

3. Pepsin scheint auf das Labenzym nicht einzuwirken.

4. Pepsin, Trypsin und Diastase wirken auf Invertin nicht ein.

5. Trypsin und Invertin wirken auf Diastase nicht ein, Pepsin scheint dagegen ein wenig schwächend zu wirken, es unterstützt die zerstörende Wirkung der Säuren.

6. Pepsin und Trypsin wirken auf Emulsin nicht ein.

7. Emulsin läfst sich mit schwefelsaurem Ammon vollständig aussalzen, wodurch es sich vom Invertin unterscheidet.

8. Wir bestätigen die Angabe von Emil Fischer, dafs das Emulsin den Milchzucker spaltet.

Als allgemeines Resultat unserer Versuche möchten wir hervorheben, dafs die Einwirkung der Enzyme aufeinander sehr beschränkt ist. Anders verhält sich die Zymase, welche durch das proteolytische Ferment des Hefesaftes bald zerstört wird.

Im Juli 1901.

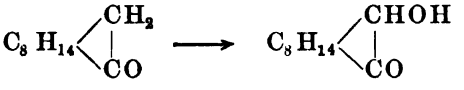
XX.

Über die Borneol- und Mentholglykuronsäure.

Von Dr. **A. Bonanni**,
Assistent am pharmakologischen Institut in Rom.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

Aus den Untersuchungen von Schmiedeberg und Meyer*) wissen wir, dafs der Campher nach seinem Durchgang durch den Organismus im Urin als α- und β-Camphoglykuronsäure austritt, Säuren, die durch die Einwirkung von Schwefelsäure leicht gespalten werden und dabei einen Oxycampher liefern, der als Campherol bezeichnet worden ist. Das Verhältnis dieses Körpers zum Campher ist folgendes:



Letztere von Schmiedeberg und Meyer aufgestellte Formel ist dann von Manasse**) 1897 als richtig nachgewiesen worden, indem er das Campherol durch Reduktion des Camphadions gewann.

Danach wird also der Campher im Organismus erst zu Campherol oxydiert und verbindet sich dann mit Glykuronsäure, bezw. einer Vorstufe derselben.

Ferner hat Hildebrandt***) für das Tannaceton, Rimini†) jüngster Zeit für das Fenchon, welche beiden Stoffe eine ketonartige

*) O. Schmiedeberg u. H. Meyer: „Über Stoffwechselprodukte nach Campherfütterung." Zeitschrift f. physiol. Chemie 3, 422 (1879).

**) O. Manasse: „Über Oxycampher." Berichte d. d. chem. Gesellschaft 30, I 659 (1897).

***) Hildebrandt: „Über Synthesen im Tierkörper." (II. Mitteilung.) Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 44, 110 (1900).

†) E. Rimini: „Ossidazione biologica del fenconе", Rendiconti della R. Accademia dei Lincei 10, I. Sem., ser. V (1901).

Struktur besitzen, gezeigt, dafs sie, in den Tierkörper eingeführt, denselben in oxydierter Form als Thujonoxyd-, bezw. als Oxyfenchoglykuronsäure verlassen.

Viele andere Körper werden dagegen ohne Oxydation in Verbindung mit Schwefelsäure und Glykuronsäure ausgeschieden. Dies zeigen die Untersuchungen von Külz*), v. Mering**), G. Hoppe-Seyler***), Thierfelder u. Mering†), Lesnik u. Nencki††), Kostanecki†††), Blum§), Nencki§§), Brahm§§§) und Fenyvessy*†).

Auch das Borneol und das Menthol liefern, wie zuerst schon 1883 Pellacani **†) gezeigt hat, gepaarte Glykuronsäuren. Die Aufgabe meiner Untersuchungen war es nun, diese Säuren, die von Pellacani nur unvollständig untersucht worden sind, und besonders auch ihre Spaltungsprodukte genauer zu charakterisieren.

---

*) E. Külz: „Über die Schicksale des Chloralhydrates und Butylchloralhydrates (Krotonchloralhydrates) im Tierkörper." Pflügers Archiv f. Physiol. **18**, 506 (1882). — Derselbe: „Über einige gepaarte Glykuronsäuren." Zeitschr. f. Biologie, S. 227 (1890).

) v. Mering: „Über das Verhalten des Chloralhydrates und Butylchloralhydrates im Organismus." Zeitschrift für physiologische Chemie **6, 480 (1882).

***) G. Hoppe-Seyler: „Über das physiologische Verhalten der Orthonitrophenylpropriolsäure." Zeitschrift für physiologische Chemie **7**, 178 (1882 bis 1883).

†) H. Thierfelder u. J. v. Mering: „Das Verhalten tertiärer Alkohole im Organismus." Zeitschr. f. physiol. Chemie **9**, 511 (1885).

††) Lesnik u. Nencki: „Über das Verhalten des α- und des β-Naphtols im Organismus." Ber. d. d. chem. Gesellch. **19**, I 1534 (1886).

†††) v. Kostanecki: „Über die Bildung von Euxanthinsäuren aus dem Euxanthon mit Hilfe des tierischen Organismus." Bericht d. d. chem. Gesellch. **19**, II 2918 (1886).

§) F. Blum: „Über Thymolglykuronsäure." Zeitschr. f. physiol. Chemie **16**, 514 (1872).

§§) Nencki: „Sur le sort des oxycétones aromatiques dans l'organisme animal." Archives des sciences biologiques de St. Pétersburg **3**, 120 (1895).

§§§) K. Brahm: „Über das Chinosol, sein Verhalten im Tierkörper und über die Bildung gepaarter Glykuronsäuren." Zeitschrift für physiol. Chemie **28**, 439 (1899).

*†) B. v. Fenyvessy: „Über das Schicksal einiger isomerer Oxychinoline (Carbostyril und Kynurin) im Tierkörper." Zeitschr. f. physiolog. Chemie **30**, 552 (1900).

†) J. P. Pellacani: „Zur Pharmakologie der Camphergruppe." Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **17, 369 (1883) und Archivio per le scienze mediche **6**, 357 (1883).

A. Borneolglykuronsäure.

Die Versuche wurden an Hunden ausgeführt, welche in Holzkäfigen mit Glasboden gehalten wurden, in denen der Harn gut aufgefangen werden konnte. Jeder Versuchshund erhielt täglich 5 g chemisch reines Borneol in Emulsion mit Milch mittelst der Schlundsonde. Das Futter bestand zumeist aus reinem Fleisch. Die Hunde vertrugen diese Borneoleinführung auch durch Wochen hindurch gut. Der Harn der Tiere hatte einen leicht aromatischen Geruch und war vollkommen klar. Mit Bleiacetat behandelt zeigte er im Polarimeter deutliche Linksdrehung. Er reduzierte Kupferoxyd in alkalischer Lösung, namentlich nach vorherigem Aufkochen mit Schwefelsäure oder Salzsäure. Beim Erwärmen des angesäuerten Harns sublimierte eine weifse Substanz, die sich an den kalten Stellen des Reagenzgläschens ansetzte.

Um die gepaarte Glykuronsäure zu isolieren, ging ich folgendermafsen vor: Der frische Tagesharn (man thut besser, keine grofsen Mengen zu sammeln, da man sonst leicht durch bakterielle Zersetzung das Produkt verliert) wird mit neutralem, essigsaurem Blei ausgefällt, filtriert und das Filtrat mit basisch essigsaurem Blei behandelt. Dieser Niederschlag wird mit warmem Wasser chlorfrei gewaschen, dann in Wasser suspendiert mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Aus dem im Wasserbad eingeengten, von überschüssigem Schwefelwasserstoff befreiten Filtrat krystallisiert die Borneolglykuronsäure aus.

Da die Substanz in Akohol und Äther löslich ist, konnte sie auch nach dem von Musculus und Mering*) für die Gewinnung der Urochloralsäure angegebenen Verfahren sowie auch nach der Methode von Külz**) dargestellt werden. Bei der Darstellung nach Külz wird der im Wasserbad eingeengte Urin mit einem Gemisch von 1 Liter Äther, 500 ccm Alkohol (90 proc.) und 30 ccm halbverdünnter Schwefelsäure so lange geschüttelt, bis kein linksdrehender Körper mehr abgegeben wird. Die gepaarte Säure geht in den Ätheralkohol über. Der Rückstand, der nach Abdampfen des Ätheralkohols bleibt, wird mit Barytwasser behandelt, um die Schwefelsäure auszufällen, das Filtrat erst mit neutralem, dann mit

*) Musculus u. Mering: „Über einen neuen Körper im Chloralharn.“ Berichte d. d. chem. Gesellsch. 8, 662 (1875).

**) E. Külz: l. c. 248.

basisch essigsaurem Blei ausgefällt und der letztere Niederschlag wie oben auf Borneolglykuronsäure verarbeitet.

Die aus warmem Wasser durch wiederholtes Umkrystallisieren rein erhaltene Substanz besteht aus Nädelchen, ist frei von Stickstoff, Schwefel, Chlor und Asche. Sie ist löslich in Wasser, Alkohol, Äther, Aceton und Chloroform. Ihre wässerige Lösung reagiert stark sauer. Nach dem Kochen mit verdünnten Mineralsäuren reduziert sie Fehlingsche Lösung. Bei der Spaltung sublimiert ein campherähnlich riechender Körper.

Das Kali-, Zink- und Kupfersalz krystallisieren in mikroskopischen Nadeln, das Calcium- und Baryumsalz ist amorph.

Zur Analyse diente ein mehrmals umkrystallisiertes Produkt, das über Schwefelsäure im Vakuum getrocknet war.

I. 0,1913 g gaben:

0,3872 g CO_2 entsprechend 55,20 Proz. C
0,1394 g H_2O „ 8,05 „ H.

II. 0,1958 g gaben:

0,3975 g CO_2 entsprechend 55,37 Proz. C
0,1439 g H_2O „ 8,17 „ H.

	Gefunden:		Berechnet auf $C_{16}H_{26}O_7 + H_2O$
I. C	55,20	55,37	55,17
II. H	8,05	8,17	8,04

Behufs Untersuchung des mit der Glykuronsäure gepaarten Körpers kochte ich eine Lösung von reiner Borneolglykuronsäure mit 5 Proz. Schwefelsäure am Rückflufskühler. Das im Kühler sich absetzende Sublimat wurde aus Äther umkrystallisiert. Der Körper erwies sich als unlöslich in Wasser, löslich in Alkohol und Äther, schmolz bei 206° und besafs im Vakuum getrocknet die Zusammensetzung des Borneols:

I. 0,1812 g gaben:

0,5142 g CO_2 entsprechend 77,39 Proz. C
0,1948 g H_2O „ 11,94 „ H.

II. 0,1830 g gaben:

0,5198 g CO_2 entsprechend 77,47 Proz. C
0,1957 g H_2O „ 11,88 „ H.

	Gefunden:		Berechnet auf $C_{10}H_{17}OH$
I. C	77,39	77,47	77,92
II. H	11,94	11,88	11,60

Trotz des etwas zu niedrig gefundenen Kohlenstoffgehalts besteht kein Zweifel, dafs der Körper mit Borneol identisch ist.

B. Mentholglykuronsäure.

Auch hier wurden die Versuche an Hunden angestellt. Dieselben erhielten 5 g chemisch reines Menthol täglich vor der hauptsächlich aus Fleisch bestehenden Fütterung.

Die Hunde vertrugen dasselbe wochenlang sehr gut. Der Harn zeigte dabei einen ausgesprochenen aromatischen Geruch, war vollkommen klar und zeigte im Polarimeter nach Behandlung mit neutralem Bleiacetat eine deutliche Ablenkung nach links. Er reduzierte Kupferoxyd in alkalischer Lösung, besonders stark, wenn er vorher mit Schwefelsäure und Salzsäure aufgekocht worden war. Bei Erwärmung des angesäuerten Harns entwickelte sich ein starker Pfefferminzgeruch, während sich zugleich an den kalten Teilen des Reagenzglases ölige Tröpfchen ansetzten.

Auch die Glykuronverbindung des Menthols konnte mit basisch essigsaurem Blei ausgefällt werden. Der Bleiessigniederschlag ergab jedoch nach Auswaschen, Zerlegen und vorsichtigem Einengen einen Syrup, der keine Neigung zur Krystallisation zeigte. Ebenso wenig gelang es, ein krystallisierendes Kalium-, Natrium- oder Baryumsalz zu gewinnen.

Kochte man die wässerige Lösung mit 5 Proz. Schwefelsäure am Rückflufskühler, so sublimierte ein blendend weifser Körper, der mit Äther aufgenommen und daraus krystallisiert erhalten wurde. Er war schwer löslich in Wasser, sehr leicht löslich in Alkohol, Äther, Schwefelkohlenstoff und Petroläther. Seinem Schmelzpunkt (42°) und der Zusammensetzung nach erwies er sich als Menthol.

I. 0,1848 g gaben:
0,5222 g CO_2 entsprechend 77,07 Proz. C
0,2163 g H_2O „ 13,00 „ H.

II. 0,1881 g gaben:
0,5294 g CO_2 entsprechend 76,76 Proz. C
0,2202 g H_2O „ 13,01 Proz. H.

	Gefunden:		Berechnet:
I. C	77,07	76,76	76,92
II. H	13,00	13,01	12,82

Das Ergebnis dieser Versuche und Analysen ist, dafs auch für die Körper der Camphergruppe das Gesetz gilt, das Sund-

vik*) schon 1886 für die Körper der aromatischen Gruppe gefunden und Nencki später**) schärfer formuliert hat, dafs die hydroxylierten Verbindungen ohne vorgängige Oxydation zur Bildung gepaarter Schwefelsäuren und Glykuronsäuren befähigt sind, nicht aber sonst gleich zusammengesetzte, welche den Sauerstoff allein in Ketonbindung enthalten. Dabei mufs zunächst noch dahingestellt bleiben, ob die Paarung solcher Alkohole mit den genannten Säuren direkt oder, wie für die Glykuronsäure E. Fischer und Piloty annehmen, mit Vorstufen derselben erfolgt, die erst nachher bei ihrem Wege durch den Organismus zu Glykuronsäure bezw. Schwefelsäure oxydiert werden.

*) E. Sundvik: „Om parningsprocesserna i djurorganismen, särskildt glykuronsyreparningarna." Akademisk afhandling, Helsingfors 1886. Ref. Maly 16, 76 (1887).

**) Nencki: l. c.

XXI.

Über den Ort der Atherschwefelsäurebildung im Tierkörper.

Von Dr. **Gustav Embden** und Dr. **Karl Glaessner**.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

1.

Baumann wurde durch den von ihm geführten Nachweis, dafs die Phenolschwefelsäure einen normalen Harnbestandteil bildet, und dafs dem Organismus von aufsen zugeführtes Phenol — wenigstens zum Teil — als Phenolschwefelsäure ausgeschieden wird, zu einer Reihe weiterer wichtiger Entdeckungen geführt. Er erkannte in Gemeinschaft mit Herter*), dafs aufser dem Phenol zahlreiche andere Substanzen als Ätherschwefelsäuren ausgeschieden werden, dafs also die Bildung der Ätherschwefelsäuren im Organismus eine weit verbreitete Erscheinung ist; er nahm auf Grund quantitativer Bestimmungen an, dafs das Phenol sich im Organismus nicht allein mit Schwefelsäure, sondern aufserdem noch mit einem anderen Körper paare, eine Annahme, die dann von Schmiedeberg**) durch die Entdeckung der Phenolglukuronsäure bewiesen wurde.

Baumann zeigte ferner, dafs durch die Bildung der Phenolschwefelsäure eine Entgiftung des Phenols stattfindet, wodurch das Vorkommen der gepaarten Schwefelsäuren eine grofse physiologische und toxikologische Bedeutung gewann.

Auch über die Lokalisation der Ätherschwefelsäurebildung

---

*) Baumann und Herter, Über die Synthese der Ätherschwefelsäuren und das Verhalten einiger aromatischer Substanzen im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie 1, 244.

**) O. Schmiedeberg, Über Oxydationen und Synthesen im Tierkörper. Archiv für exp. Pathologie und Pharmakologie 14, 307.

im Organismus suchte Baumann Aufklärung zu gewinnen. Schon in seiner ersten gröfseren Arbeit über die gepaarten Schwefelsäuren im Organismus*) teilte er mit, dafs bei mit Phenol vergifteten Hunden vorübergehend eine sehr erhebliche Anhäufung phenolbildender Substanz in der Leber stattfindet. So konnte er in einem Falle aus 100 Gewichtsteilen Leber 19 mal so viel Tribromphenol gewinnen als aus 100 Gewichtsteilen Blut. Interessanterweise fand Baumann aber bei weitem nicht die dieser Menge Tribromphenol äquivalente Schwefelsäuremenge, und gerade dieser Befund führte ihn zur Annahme, dafs es aufser der Phenolschwefelsäure noch eine andere gepaarte Verbindung des Phenols gäbe. Auf diesen Punkt werden wir später noch zurückkommen müssen.

Weitere Untersuchungen in dieser Richtung stellte Baumann in Gemeinschaft mit Christiani an**). Christiani und Baumann konstatierten einmal, dafs nach Unterbindung der Ureteren bei phenolvergifteten Tieren keine Anhäufung von gepaarter Schwefelsäure im Blute stattfindet; sie halten es auf Grund dieses Befundes für in hohem Grade wahrscheinlich, dafs nach Unterbindung der Ureteren die Niere bei der Bildung der Phenolschwefelsäure überhaupt nicht mehr beteiligt ist, eine Schlufsfolgerung, der wir allerdings nicht beistimmen können.

Weit beweisender war eine zweite Reihe von Versuchen, die Christiani und Baumann anstellten. Sie unterbanden bei phenolvergifteten Tieren die Nierenarterien und Nierenvenen und konstatierten, dafs danach die Menge der Phenolschwefelsäure nicht vermindert war, woraus in unzweideutiger Weise hervorging, dafs „der ausschliefsliche Ort der Bildung der Phenolschwefelsäure im Tierkörper (beim Hunde) die Niere jedenfalls nicht ist". Gemeinschaftlich mit Herter wurde schliefslich noch ein Durchleitungsversuch mit Kalbsnieren nach dem Verfahren von Bunge und Schmiedeberg angestellt. In dem Blute, welchem geringe Mengen Phenol und schwefelsaures Natrium zugesetzt worden waren, konnte nach der Durchleitung keine Phenolschwefelsäure nachgewiesen werden.

Eine andere Methode wandte Kochs***) an, der in Pflügers Laboratorium Untersuchungen über den Ort der Bildung der Ätherschwefelsäure im Organismus anstellte.

---

*) Über gepaarte Schwefelsäuren im Organismus. Pflügers Archiv 13, 297.

**) A. Christiani und E. Baumann, Über den Ort der Bildung der Phenolschwefelsäure im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie 2, 350.

***) Wilhelm Kochs, Pflügers Archiv 20, 64; daselbst 23, 161.

Kochs zerkleinerte die zu untersuchenden Organe, welche teils von Kälbern, teils von Hunden stammten, mit der Fleischhackmaschine, fügte dem Organbrei Blut von derselben Tierart hinzu und digerierte das Gemenge unter Zusatz von Phenol und schwefelsaurem Natrium, teils bei Temperaturen, die der Körpertemperatur nahe kamen, teils bei weit niedrigeren (8 bis 12°) kürzere oder längere Zeit im Luftstrome.

Die Organe, auf welche Kochs seine Versuche ausdehnte, waren Leber, Niere, Pankreas, Muskel und Thymus. Da wir Kochs' Resultate teilweise noch im einzelnen zu besprechen haben werden, gehen wir hier zunächst nicht näher auf seine Arbeiten ein, sondern erwähnen nur, dafs Kochs an den vier erstgenannten Organen positive Resultate, an der Thymusdrüse dagegen ein negatives erhielt.

Ferner sei noch erwähnt, dafs aufser der Phenolschwefelsäuresynthese auch die Synthese der gepaarten Schwefelsäuren der drei Dioxybenzole mittels der eben angedeuteten Methode gelang.

Landi*) wiederholte die Versuche von Kochs mit der Leber. In vitro konnte er die Synthese der Phenolschwefelsäure dabei nicht beobachten, da die leicht eintretenden Fäulnisprozesse die Beobachtung störten. Aufserdem machte der Autor Versuche mit künstlicher Zirkulation durch verschiedene Organe, insbesondere den Darm. Aus seinen Versuchen schlofs Landi, dafs nicht die Leber, sondern der Darm der Sitz dieses synthetischen Prozesses ist.

Finizio**) glaubte, eine von Reale***) ausgesprochene Ansicht, dafs die Leber der Sitz der Ätherschwefelsäurebildung sei, durch klinische Untersuchungen bestätigen zu können. Er fand, dafs bei einem Kranken mit Lebercirrhose, bei dem eine starke

*) L. Landi, Beitrag zur Kenntnis der Phenylschwefelsäure im Organismus. VII. Kongrefs für innere Medizin in Rom 1896. Zitiert nach Malys Jahresberichten 27, 645.

**) Finizio, Beitrag zur Kenntnis des Sitzes der Synthese der Ätherschwefelsäuren. Riv. chim. e terap., fasc. 8, 1897, zitiert nach Malys Jahresberichten 27, 425.

***) Die Arbeit von Reale war uns leider nicht im Original zugänglich. Doch erfuhren wir durch eine freundliche briefliche Mitteilung des Herrn Dr. Ducceschi in Rom, dafs Reale die Ätherschwefelsäuresynthese deswegen in die Leber verlegte, weil er bei Versuchen, die er im Jahre 1889 gemeinschaftlich mit Massenga anstellte, nach Unterbindung der Lebergefäfse bei einem Hunde, dem unmittelbar vor der Unterbindung Phenol injiziert worden war, keine Phenolschwefelsäure mehr im Harne auftreten sah.

Verminderung der Harnstoffausfuhr (im Mittel 10 g Harnstoff in 24 Stunden) und aufserdem alimentäre Glykosurie vorhanden war, nach Thymoldarreichung das Verhältnis der gepaarten zur präformierten Schwefelsäure im Harne nur ganz minimal erhöht war, während Thymoldarreichung bei Gesunden und bei Kranken mit Echinokokkus der Leber eine sehr erhebliche Steigerung dieses Verhältnisses hervorrief. Es soll mit dieser Thatsache ein „relativer" Beweis dafür gegeben sein, dafs die Synthese der Ätherschwefelsäuren eben in der Leberzelle ihren Sitz habe.

S. Lang*) untersuchte im Harn von Gänsen das Verhältnis der präformierten zur gepaarten Schwefelsäure vor und nach der Exstirpation der Leber. Leider waren aber, wie Lang hervorhebt, die für die gepaarte Schwefelsäure erhaltenen Zahlen so klein, dafs sie sich meist knapp an den Fehlergrenzen der Bestimmung bewegten und ein bestimmter Schlufs aus ihnen nicht gezogen werden konnte. Doch war aus diesen Versuchen jedenfalls zu ersehen, dafs die Ätherschwefelsäuren nach der Leberexstirpation nicht fehlen. Lang hebt hervor, dafs somit kein Grund vorhanden sei, „die Synthese derselben als eine ausschliefslich an die Leber geknüpfte Funktion zu betrachten".

2. Methodisches.

Bei unseren eigenen Untersuchungen, die auf die Ermittelung der Lokalisation der Ätherschwefelsäurebildung im Organismus gerichtet waren, bedienten wir uns der Durchleitungsmethode. Wir wandten ausschliefslich Organe und Blut von Hunden an.

Die Technik der Durchblutung bot gegenüber früheren Arbeiten nicht viel Neues. Das Blut floſs abwechselnd aus zwei Scheidetrichtern durch eine Schlauchleitung und eine Heizspirale, in der das Blut auf 40° erwärmt wurde, zum Organ. Der erforderliche Druck wurde durch ein Wasserstrahlgebläse hergestellt, dessen Druckleitung in die obere Öffnung des jeweils in Thätigkeit befindlichen Scheidetrichters einmündete. Der Druck konnte durch Regulierung des Wasserabflusses aus dem Gebläse beliebig variiert werden. In die Druckluftleitung war eine kleine Waschflasche eingeschaltet, die bis zur Höhe von etwa 6 cm mit Quecksilber gefüllt war. Die Druckluft passierte diesen Widerstand in einigermafsen gleichmäfsigen Zeitabständen, und jede durchtretende Luftblase rief eine nicht ganz geringe Blutdruckschwankung hervor. Die Blutdruckhöhe konnte an einem Quecksilbermanometer abgelesen werden, das vermittelst eines T-Rohres mit dem blutzuführenden Schlauche verbunden war. Das aus dem Organe aus-

*) S. Lang, Über die Schwefelausscheidung nach Leberexstirpation. Zeitschr. f. physiol. Chemie 29, 305.

strömende venöse Blut floſs durch einen Gummischlauch in die Mündung eines Trichters, dessen langes Rohr durch die eine Bohrung eines doppelt perforierten Gummistopfens bis auf den Boden einer Flasche reichte. In der anderen Bohrung des die Flasche verschliefsenden Gummistopfens steckte eine nur bis in den Hals der Flasche reichende Glasröhre. Diese Glasröhre war durch eine Schlauchleitung unter Zwischenschaltung einer Sicherheitsflasche mit dem saugenden Hahn des Wasserstrahlgebläses verbunden. Die neben dem einströmenden Blut durch die Trichterröhre gesaugte Luft mufste das in der Flasche sich ansammelnde Blut passieren und bewirkte sehr rasch eine ausgiebige Arterialisierung des Blutes.

Der bei der Arterialisierung stets sich reichlich bildende Blutschaum stieg fast immer in die vorgelegte Sicherheitsflasche über, wo er durch die ihn zuführende Röhre gegen den oberen Teil der Flaschenwand geleitet wurde und sich rasch wieder verdichtete.

Noch während der eine Scheidetrichter in Thätigkeit war, wurde das Blut aus der Arterialisierungsflasche in den jeweils unbenutzten zweiten Scheidetrichter übergefüllt. Sobald dann der erste Scheidetrichter nahezu entleert war, wurde einfach der Glashahn abgedreht und der zweite Scheidetrichter in Thätigkeit gesetzt. Die Durchleitung erlitt so kaum eine Unterbrechung.

Bei unseren Versuchen wurden, wie das früher öfter geschehen ist, fast immer zwei Hunde verwendet, ein gröfserer, von dem nur das Blut, und ein kleinerer, von dem aufser dem Blute auch das zu durchblutende Organ in Anwendung kam.

Um eine möglichst grofse Blutmenge zu gewinnen, wurden die Hunde in Äthernarkose aus beiden Karotiden gleichzeitig entblutet und ferner gegen Ende der Entblutung Thorax und Abdomen stark komprimiert. Der verwendete Operationstisch gestattete auch, das Kopfende des Tieres stark zu senken.

Das gewonnene Blut wurde defibriniert und durch einen unten spitz zulaufenden Leinwandsack koliert. Wo es nötig war, wurde das Blut nochmals koliert, wenn es zum erstenmal das Organ passiert hatte. Bei der Füllung des Apparates wurde natürlich sorgfältig darauf geachtet, dafs nirgends Luftblasen vorhanden waren. Weitere methodische Bemerkungen werden wir noch bei der Schilderung der Durchblutungsversuche im einzelnen zu machen haben.

Unsere Versuche erstreckten sich auf die Leber, die Muskeln, die Niere, die Lunge und den Dünndarm.

3. Leberversuche.

Die Operationstechnik wich im wesentlichen nicht von der von früheren Autoren angewandten ab. Zunächst wurde das Abdomen seitlich von der Linea alba, unter möglichster Schonung des Zwerchfells, in seiner ganzen Länge eröffnet, und ebenso das Thoraxinnere durch Heraustrennen des Brustbeins und der Rippen-

knorpel in grofser Ausdehnung freigelegt. Nun wurde die Leber nach oben geklappt, Leberarterie und Gallengang nach doppelter Unterbindung zwischen den Ligaturen durchschnitten und darauf in die Pfortader eine möglichst grofse Kanüle eingeführt*). Es folgte die Unterbindung der Vena cava inferior möglichst dicht unterhalb der Leber**). Alsdann wurde in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells eine recht dicke Kanüle eingeführt. Nun wurden die noch übrigen Bänder der Leber — soweit nötig, nach vorheriger Anlegung von Massenligaturen — durchtrennt, das Zwerchfell ringsum unmittelbar an seinem Ansatze an der Thoraxwand abgeschnitten und jetzt Leber und Zwerchfell gemeinsam unter Durchtrennung aller Verbindungsstränge aus dem Tierkörper entfernt.

Leber und Zwerchfell wurden dann in eine feuchte Kammer, die durch ein Wasserbad auf etwa 39 bis 40° gehalten wurde, gebracht, die Pfortaderkanüle unter den üblichen Kautelen mit dem blutzuführenden Schlauche, die Hohlvenenkanüle mit dem blutabführenden Schlauche verbunden. Dann wurde der Apparat in Thätigkeit gesetzt.

Versuch I.

Bei diesem Versuche wurde das Blut (etwa $1^1/_2$ Liter) von einem grofsen und die Leber***) von einem ganz kleinen Hunde verwendet. Dem Blute wurde etwas weniger als 1 g Phenol in wässeriger Lösung von 4 Proz. zugefügt, aufserdem etwa 1 g Cystin,

---

*) In der Pfortaderkanüle resp. im Hauptaste der Pfortader bildet sich sehr leicht ein äufserst störendes Gerinnsel. Um dieses sicher beseitigen zu können, führten wir von der Kanüle aus unmittelbar, nachdem sie eingebunden war, einen dicken Faden möglichst tief in die Vena portae ein. Das äufsere Ende des Fadens wurde zunächst an der Kanüle festgebunden. Der Faden wurde erst unmittelbar vor der Verbindung der Kanüle mit dem blutzuführenden Schlauch entfernt und gleichzeitig das ihm fest anhaftende Gerinnsel.

**) Um bequem an die Stelle gelangen zu können, wo die Hohlvene hinter die Leber tritt, ist es zweckmäfsig, vorher die von der Leber zur rechten Niere ziehende Peritonealfalte zu durchtrennen.

***) Von einer Wiedergabe der Lebergewichte sehen wir ab, da die Leber stets erst am Ende des Durchblutungsversuches gewogen wurde, wo ihr Blutgehalt und somit ihr Gewicht je nach dem während der Durchblutung zur Verwendung gekommenen Druck ein aufserordentlich verschiedener war.

das in einigen Kubikzentimetern verdünnter Sodalösung teils gelöst, teils in ganz feinen Teilchen suspendiert war*).

Anfänglich flofs das Blut bei mäfsigem Drucke (40 bis 60 mm Quecksilber) in starkem Strahle durch die Leber, nach etwa zwei Stunden wurde das Organ zeitweilig schwerer durchgängig, so dafs der Druck auf über 100 mm Quecksilber gesteigert werden mufste. Doch verschwand das Stromhindernis bald wieder. Die Durchleitung dauerte fünf Stunden.

Die durch die starke Blutfüllung aufserordentlich vergröfserte Leber wurde zerhackt und blieb die Nacht über unter reichlichem Alkohol von 95 Proz. stehen.

Der Alkohol wurde am nächsten Morgen abgesaugt, und die Leber noch mehrmals mit Alkohol extrahiert. Die vereinigten Alkoholextrakte wurden bei ganz niedrigem Drucke destilliert, bis die Flüssigkeit im Destillationskolben stark zu schäumen anfing. Sie wurde nun durch Kochen bei schwach essigsaurer Reaktion möglichst enteiweifst und zugleich die letzten Spuren noch vorhandenen Alkohols verjagt. Dann wurde vom Eiweifs abfiltriert und das klare Filtrat so lange destilliert, bis das Destillat keine Trübung mit Bromwasser mehr gab **).

Alsdann wurde die Flüssigkeit mit siedender Chlorbaryumlösung im Überschusse versetzt und noch einige Minuten gekocht.

Das nach einigen Stunden gewonnene, völlig klare Filtrat wurde mit einer reichlichen Menge konzentrierter Salzsäure versetzt und $1^1/_2$ Stunden am Rückflufskühler zum Sieden erhitzt. Hierbei trat zunächst eine Trübung, dann eine Bräunung der Flüssigkeit und Abscheidung schmieriger brauner Massen ein.

Die Flüssigkeit wurde nun wieder destilliert; zum schwach sauren Destillat zugefügtes Bromwasser rief sofort einen starken Niederschlag hervor, der bald krystallinisch wurde; es dauerte über eine Stunde, bis alles Phenol übergegangen war.

Der Niederschlag wurde am nächsten Tage auf ein getrocknetes und gewogenes Filter gebracht, im Exsikkator über Schwefelsäure getrocknet und gewogen.

Der durch die eben erwähnten braunen Abscheidungen verunreinigte Niederschlag von schwefelsaurem Baryt wurde auf einem aschen-

---

*) Da der Schwefel der im Organismus entstehenden Ätherschwefelsäuren zweifellos aus dem schwefelhaltigen Komplex des Eiweifsmoleküls — dem Cystein resp. Cystin — stammt, lag es nahe, zu untersuchen, ob Zufügen von Cystin zu dem mit Phenol versetzten Blute die Bildung der Phenolschwefelsäure (oder einer Vorstufe derselben) begünstige. Doch haben unsere Versuche in dieser Hinsicht kein beweisendes Resultat ergeben. Wir werden daher im folgenden auf den bei den ersten drei Leberversuchen erfolgten Cystinzusatz kaum noch einzugehen haben.

**) Später stellte es sich heraus, dafs es notwendig ist, als Endreaktion die Millonsche Probe zu benutzen. Diese tritt noch ein zu einer Zeit, wo Zusatz von Bromwasser zum Destillat keine Trübung oder wenigstens keine sofortige Trübung mehr hervorruft.

freien Filter bis zur Chlorfreiheit mit heifsem Wasser gewaschen und dann samt dem Filter verascht.

Gewicht des Tribromphenols 0,1290 g. Gewicht des Baryumsulfats 0,0110 g.

Benedikt*) hat bekanntlich gefunden, dafs überschüssiges Bromwasser in wässerigen Phenollösungen Tribromphenolbrom erzeugt. Schmiedeberg**) führte diese letztere Verbindung dadurch in einfaches Tribromphenol über, dafs er den auf einem Filter gesammelten Niederschlag in Alkoholäther löste, die Lösung bei gelinder Temperatur verdunsten liefs und den Rückstand über Schwefelsäure stellte, bis sich keine Bromdämpfe mehr entwickelten. Zuweilen war eine Wiederholung des Auflösens und Eintrocknens nötig. Doch geht aus den Versuchen von Landolt***) hervor, dafs man keinen erheblichen Fehler macht, wenn man den auf dem Filter gesammelten Niederschlag direkt über Schwefelsäure trocknet und als Tribromphenol wägt, worauf auch Baumann†) hinweist. Wir haben daher unsere Niederschläge ohne vorherige Auflösung in Alkoholäther getrocknet.

Versuch II.

Der Versuch wurde in ganz derselben Weise wie der vorige angestellt, nur kam die Leber von einem gröfseren Hunde zur Verwendung. Die zugesetzte Phenolmenge betrug 0,8 g. Aufserdem wurde wieder etwas Cystin in Sodalösung hinzugefügt.

Nach etwa $1^1/_2$ stündiger guter Durchblutung geht die Hauptmasse des Blutes durch Unfall verloren, so dafs der Versuch unterbrochen werden mufs. Die nach der beim vorigen Versuch beschriebenen Methode verarbeitete Leber lieferte eine nicht unerhebliche Menge Tribromphenol aus gepaarten Verbindungen und ebenso auch einen ziemlich reichlichen Niederschlag von Baryumsulfat.

Das nach dem Unfall noch vorhandene Blut (etwa 400 ccm) wurde ebenfalls verarbeitet. Es wurde zu diesem Zwecke durch Eingiefsen in etwa das doppelte Volum siedenden Wassers, dem etwas Kochsalz und die nötige Essigsäuremenge zugefügt wurde, koaguliert. Das klare, farblose Filtrat wurde im Vakuum bis auf etwa 150 ccm eingeengt, wobei es sich wieder stark trübte. Alsdann wurde es im Becherglase durch Sieden bei schwach essigsaurer Reaktion nochmals enteiweifst, und das gewonnene klare Filtrat genau in derselben Weise weiter behandelt, wie es bei Versuch I für das Leberextrakt geschildert ist.

Die Menge des Tribromphenols aus gepaarten Verbindungen betrug 0,0325 g, die des Baryumsulfats 0,0226 g.

*) Benedikt, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft **12**, 1005.

) Schmiedeberg, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **14, 304.

***) H. Landolt, Bromwasser als Reagens auf Phenol und verwandte Körper. Ber. d. d. chem. Ges. **4**, 770.

†) Baumann, Über den Nachweis und die Darstellung von Phenolen und Oxysäuren im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie **6**, 185.

Versuch III.

Die Leber stammte von einem mittelgrofsen Hunde. Die am Anfange der Durchblutung vorhandene Blutmenge betrug 1300 bis 1500 ccm. Menge des Phenols 0,6 g, des Cystins 1,3 g. Das Cystin war in 50 ccm einer 6 proz. Sodalösung völlig gelöst.

Das Blut flofs die ganze Zeit in starkem Strahle aus der Vene. Durchblutungsdauer vier Stunden. Die Leber und 835 ccm Blut wurden dann in der oben geschilderten Weise verarbeitet.

Aus der Leber wurden 0,1545 g Tribromphenol und 0,0458 g Baryumsulfat aus gepaarten Verbindungen gewonnen.

Die verarbeiteten 835 ccm Blut lieferten 0,2362 g Tribromphenol, während der Baryumsulfatniederschlag nicht gewogen wurde. Aus Leber und Blut zusammen wurden also bei diesem Versuche, 0,3907 g Tribromphenol erhalten.

Versuch IV.

Die Blutmenge betrug am Anfange des Versuches mehr als zwei Liter, die Leber war sehr klein. Es wurden 0,5 g Phenol, dagegen kein Cystin hinzugesetzt, wohl aber, um bis auf das Fehlen des Cystins möglichst gleiche Versuchsbedingungen herzustellen, wie beim vorigen Versuch, nahezu 3 g Natriumkarbonat in einer Lösung von 6 Proz.

Die ersten $1^1/_2$ Stunden flofs ein kräftiger Blutstrahl bei niedrigem Drucke (unter 60 mm) ab. Später verstopften sich die Gefäfse mehr und mehr, so dafs das Blut schliefslich nur noch bei hohem Drucke (bis 180 mm) tropfenweise durchging. Durchleitungsdauer vier Stunden.

Von den am Ende des Versuches vorhandenen 1500 ccm Blut werden nur 1000 ccm verarbeitet.

Die Leber lieferte 0,0282 g Tribromphenol und 0,0175 g Baryumsulfat aus gepaarten Verbindungen. Das Blut 0,0238 g Tribromphenol.

Versuch V.

Die zur Verfügung stehende Blutmenge betrug etwa 1000 ccm. Die durchblutete Leber war sehr klein.

Es wurden 0,4 g Phenol und $2^1/_2$ g Natriumkarbonat in 6 proz. wässeriger Lösung hinzugefügt. Das Blut flofs die ganze Zeit über in starkem Strahle aus der Vene, trotzdem der Druck während der ganzen Versuchsdauer nicht über 35 mm stieg. Durchblutungsdauer vier Stunden.

Die Leber lieferte 0,0661 g Tribromphenol und 0,0100 g Baryumsulfat aus gepaarten Verbindungen.

Aus den bisherigen Versuchen geht in Übereinstimmung mit Kochs und im Widerspruche mit Landi hervor, dafs die Leber im stande ist, Phenol in gepaarte Verbindungen überzuführen.

	Leber				Blut				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Menge des gefundenen Tribromphenols	Menge des gefundenen Baryumsulfats	Dem Tribromphenol äquivalente Baryumsulfatmenge	Davon gefunden	Menge des gefundenen Tribromphenols	Menge des gefundenen Barymsulfats	Dem Tribromphenol äquivalente Baryumsulfatmenge	Davon gefunden	Bemerkungen
	g	g	g	Proz.	g	g	g	Proz.	
1	0,1290	0,0110	0,0909	12,1	—	—	—	—	Cystinzusatz
2	—	—	—	—	0,0325	0,0226	0,0229	98,7	Cystinzusatz
3	0,1545	0,0458	0,1088	42,5	0,2362	—	—	—	Cystinzusatz
4	0,0282	0,0175	0,0198	88,4	0,0238	—	—	—	Kein Cystinzusatz
5	0,0661	0,0100	0,0465	21,5	—	—	—	—	Kein Cystinzusatz

Betrachtet man die vorstehende Tabelle, die eine Übersicht über die bei den einzelnen Versuchen erhaltenen Zahlen für Tribromphenol und Baryumsulfat giebt, so fällt namentlich auf, dafs die erhaltenen Mengen Baryumsulfat weit hinter denen zurückbleiben, welche man hätte finden müssen, wenn alles gepaarte Phenol in Form von Phenolschwefelsäure vorhanden gewesen wäre. Um einen Überblick hierüber zu gewinnen, ist in Kolonne 3 und 7 der Tabelle die dem gefundenen Tribromphenol äquivalente Menge Baryumsulfat vermerkt, während Kolonne 4 und 8 angeben, wieviel Prozent von der dem Tribromphenol äquivalenten Baryumsulfatmenge gefunden wurden.

Wie man sieht, schwankt diese Prozentzahl bei der Leber aufserordentlich, von 12,5 bis 92,2 Proz. Beim Blute sind leider nur in einem Falle Baryumsulfat und Tribromphenol gleichzeitig gewogen. Hier fällt die gefundene und berechnete Schwefelsäuremenge zusammen, so dafs angenommen werden mufs, dafs hier alles Phenol in Form von Phenolschwefelsäure vorhanden war.

Schon Baumann*) hat, wie bereits oben bemerkt, bei der Untersuchung der Leber phenolvergifteter Hunde dieses Mifsverhältnis zwischen Phenol und Schwefelsäure beobachtet und daraus

*) E. Baumann, Pflügers Archiv 13, 298.

auf das Vorhandensein einer zweiten phenolbildenden Substanz geschlossen. Auch in den Versuchen von Kochs*) war die Menge der gepaarten Schwefelsäure bei weitem nicht der Menge des gepaarten Phenols äquivalent.

Die von Schmiedeberg**) gefundene Thatsache, dafs nach Einbringung von Benzol resp. Phenol in den Organismus aufser der gepaarten Schwefelsäure auch die gepaarte Glykuronsäure des Phenols im Harn auftritt, veranlafste uns naturgemäfs, sowohl in den durchbluteten Organen selbst, wie in dem zur Durchleitung benutzten Blut nach Glykuronsäure zu suchen.

Wir erhitzten zu diesem Zwecke ähnlich wie Tollens und Mann***) und nach ihnen Mayer und Neuberg†) die auf gepaarte Glykuronsäure zu untersuchenden enteiweifsten Flüssigkeiten bei einem Gehalt von etwa 1 Proz. freier Mineralsäure im Autoklaven etwa eine Stunde lang auf 100°. Da wir hiernach aber keine deutliche Zunahme der auf etwa vorhandene Glykuronsäure hindeutenden Phloroglucin- und Orcinreaktion beobachten konnten, mufsten wir einen Versuch, die Glykuronsäure selbst oder eine ihrer charakteristischen Verbindungen darzustellen, von vornherein für aussichtslos halten. Unsere Versuche blieben in dieser Richtung also unentschieden. Wir behalten uns aber vor, sie mit einem geeigneteren Paarling, als das Phenol ist, wieder aufzunehmen.

Übrigens mufs man auch an die Möglichkeit denken, dafs neben Phenolschwefelsäure (und vielleicht Phenolglykuronsäure) in der Leber eine schwefelhaltige Vorstufe der Phenolschwefelsäure gebildet wird, und dafs diese schwefelhaltige Vorstufe einen Teil der in diesem Organ gefundenen „phenolbildenden Substanz" ausmacht. Denn der sichere Nachweis, dafs die Schwefelsäure selbst im stande ist, sich einfach unter Wasseraustritt mit Phenol zu paaren, ist unseres Erachtens bisher nicht geführt worden. Den bekannten Versuch von Baumann††), welcher zeigte, dafs nach Verfütterung von 3 g Natriumsulfat bei einem phenolvergifteten Hunde am nächsten Tage keine ungepaarte Schwefelsäure im Harn auftrat, können wir nicht als beweisend ansehen.

Von den verschiedenen möglichen Einwänden wollen wir hier nur den nächstliegenden erwähnen, dafs es nämlich fraglich er-

*) W. Kochs, Pflügers Archiv 20, 75 und 79.
**) O. Schmiedeberg, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 14, 307.
***) Tollens und Mann, Annalen der Chemie, S. 290 (1896).
†) Mayer und Neuberg, Zeitschrift für physiolog. Chemie 29, 263.
††) E. Baumann, Pflügers Archiv 13, 296.

scheint, ob das verfütterte Natriumsulfat von dem durch die Vergiftung veränderten Darmkanal überhaupt in erheblicher Menge resorbiert wurde. Möglicherweise wurde es zum gröfsten Teile einfach per rectum wieder ausgeschieden.

Direkt gegen die Möglichkeit, dafs Phenol sich mit schwefelsauren Salzen paart, sprechen die unter Hofmeisters Leitung von Tauber*) an phenolvergifteten Tieren mit Natriumsulfat angestellten antidotarischen Versuche. Tauber konnte bei Kaninchen, welche die eben tödliche Dosis Phenol subkutan erhalten hatten, durch Natriumsulfat weder bei intravenöser noch bei subkutaner Applikation eine Entgiftung erzielen. Auch vor der Vergiftung verfüttertes Natriumsulfat blieb wirkungslos. Hingegen hatte schwefligsaures Natrium (wie auch oxyäthansulfosaures Natrium) eine unverkennbare, entgiftende Wirkung.

Kochs hat bei seinen mehrfach erwähnten Versuchen dem Organbrei aufser Phenol stets Natriumsulfat hinzugefügt. War dieses zugefügte Natriumsulfat bei der Bildung der Phenolschwefelsäure wirklich beteiligt, so wäre zu erwarten, dafs bei den Versuchen von Kochs die Menge der erhaltenen gepaarten Schwefelsäure gegenüber der Menge des erhaltenen gepaarten Phenols relativ gröfser wäre als bei unseren Versuchen 4 und 5, wo aufser Phenol nur etwas Natriumkarbonat hinzugefügt wurde.

Das ist nun in der That nicht der Fall, wie aus einem Vergleich der Versuche 19, 27 und 28 der ersten Arbeit von Kochs mit unseren Versuchen 4 und 5 leicht zu ersehen ist.

War also einerseits bei den Versuchen von Kochs der Zusatz von Natriumsulfat allem Anschein nach durchaus entbehrlich, so läfst sich allerdings andererseits bei der Kleinheit der von uns erhaltenen absoluten Schwefelsäuremengen die Möglichkeit nicht ohne weiteres von der Hand weisen, dafs die von uns erhaltene gepaarte Schwefelsäure aus von vornherein vorhandenen schwefelsauren Salzen entstand.

4. Versuche am Muskel.

Versuch I.

Es kamen zwei Hunde zur Verwendung.

Die angewandte Technik, für deren Demonstration wir Herrn Dr. Holmes C. Jackson aus New York auch an dieser Stelle

*) Siegfried Tauber, Archiv für exp. Pathologie und Pharmakologie 36, 197.

unseren verbindlichsten Dank aussprechen, war höchst einfach. Bei dem zu durchblutenden kleineren Hunde wurde unmittelbar nach der Entblutung aus beiden Karotiden die Bauchhöhle in der Linea alba vom Processus xiphoideus etwa 25 cm nach abwärts eröffnet, das Rektum möglichst tief doppelt unterbunden und zwischen beiden Ligaturen durchtrennt, alsdann der Magen an der Kardia ebenfalls zwischen zwei Ligaturen durchschnitten und nun Magen und Darm entfernt; auch die Leber wurde herausgenommen.

Es folgte die Freilegung der Aorta und Vena cava an ihrem unterhalb des Abganges der Nierengefäfse gelegenen Teil; die innerhalb dieses Gebietes abgehenden Seitenäste wurden unterbunden und alsdann in die Aorta und die Vena cava möglichst kurz über ihrer Gabelung Kanülen eingebunden. Längs der beiden Seitenränder der Bauchwunde wurde je eine Massenligatur angelegt, aufserdem noch auf jeder Seite in der Höhe des unteren Nierenpols eine querlaufende Ligatur, welche Haut und Muskulatur umfafste. Der hintere Teil des Tieres wurde alsdann in eine Wanne mit Wasser von 39 bis 40° gebracht, derart, dafs die hinteren Extremitäten zwar völlig eintauchten, aber kein Wasser in die Bauchhöhle lief. Nunmehr wurden Arterien- und Venenkanüle in ganz derselben Weise, wie bei den Leberversuchen, mit dem zuführenden resp. dem abführenden Schlauch in Verbindung gebracht, und die Durchleitung in Gang gesetzt.

Dem Blute (etwa 1600 ccm) wurden 0,5 g Phenol zugesetzt. Das Blut flofs in kräftigem Strahle und sehr dunkel aus der Vene, es wurde in derselben Weise wie bei den Leberversuchen arterialisiert. Es trat so gut wie gar keine Blutung ein.

Die Dauer der Durchblutung betrug drei Stunden.

Alsdann wurde die Muskulatur der unteren Extremitäten abpräpariert, von Faszien und namentlich von Fett sorgfältig befreit (Gewicht 350 g), zerhackt und in derselben Weise wie früher die Leber mit Alkohol extrahiert. Auch die weitere Behandlung des alkoholischen Extraktes und des durchgeleiteten Blutes wich nicht von der bei der Leber beschriebenen ab. Von den 1400 ccm Blut, die nach der Durchblutung erhalten wurden, gelangten 1000 zur Verarbeitung. Das freie Phenol wurde bis zum Verschwinden der Millonschen Reaktion abdestilliert. Nach dem Erhitzen mit Salzsäure am Rückflufskühler ging keine Spur Phenol mehr über. (Es trat im schwach sauren Destillat weder Trübung mit Bromwasser, noch Rotfärbung beim Kochen mit Millons Reagens auf.)

Aus dem Muskelextrakt wurde das freie Phenol nur bis zum

Verschwinden der sofortigen Trübung des Destillats mit Bromwasser herausdestilliert. Die Millonsche Reaktion bestand zur Zeit der Unterbrechung der Destillation noch. Nach dem Erhitzen mit Salzsäure schieden sich im Kühler und auf der Oberfläche des Destillats die bei Destillation tierischer Flüssigkeiten so häufig zu beobachtenden Membranen ab. Auf Zusatz von Bromwasser kam es zunächst und auch später zu keiner sichtbaren Trübung. Doch ergab eine nach einiger Zeit vorgenommene sorgfältige mikroskopische Durchmusterung das Vorhandensein äufserst spärlicher zwischen den Membranen gelegener und augenscheinlich aus Bromtribromphenol bestehender Kryställchen. Die Menge derselben lag weit unterhalb der Grenze der Wägbarkeit. Da das unveränderte Phenol, wie aus dem Fortbestehen der Millonschen Reaktion hervorgeht, nicht völlig abdestilliert worden war, ist es kaum gestattet, die minimale, nach Salzsäurezusatz im Destillat nachweisbare Bromtribromphenolmenge auf etwas anderes als einen Rest nicht abdestillierten freien Phenols zurückzuführen.

Versuch II.

Der Versuch wurde in ganz derselben Weise wie der vorige angestellt. Da nach der Angabe von Kochs die Muskelsubstanz weit empfindlicher gegen die giftige Wirkung des Phenols sein soll als die Lebersubstanz, wurde den zur Verwendung kommenden 1200 ccm Blut nur 0,1 g Phenol hinzugefügt. Um auch im übrigen eine möglichst enge Anlehnung an die Versuchsbedingungen von Kochs zu erzielen, fügten wir ferner noch 3 g Natriumsulfat hinzu. Auch hier war das rasch der Vene entströmende Blut sehr stark venös. Es trat eine nicht ganz unerhebliche Blutung ein, die sich aber beherrschen liefs. Die Durchblutungsdauer betrug $2^1/_2$ Stunden. Die nach dieser Zeit freigelegten Muskeln der unteren Extremitäten waren für mechanische Reize noch erregbar. Nach der Reinigung von Fett und Faszien betrug ihr Gewicht 240 g. Das Blut reagierte nach der Durchblutung deutlich alkalisch. Es wurde die gesamte Muskulatur und aufserdem 500 ccm Blut verarbeitet. Das freie Phenol wurde diesmal bis zum Verschwinden der Millonschen Reaktion im Destillate vertrieben. Weder aus dem Blute noch aus der Muskulatur wurde die geringste Menge gepaarten Phenols gewonnen.

Das Ergebnis unserer Muskelversuche steht im Widerspruch mit den Versuchsresultaten von Kochs, welcher beim Digerieren von Muskelbrei und Blut mit Phenol und Natriumsulfat Tribrom-

phenol aus gepaarten Verbindungen erhielt. In dem einen Falle, wo Kochs die Wägung des Tribromphenolniederschlages vornahm, erhielt er sogar die nicht unerhebliche Menge von 0,009 g Tribromphenol.

Ebenso erhielt Kochs*) bei einem Versuch mit Muskelsubstanz und Brenzkatechin ein positives Resultat. Sowohl bei den Phenolversuchen wie bei den mit Brenzkatechin angestellten beobachtete er auch das Auftreten von Baryumsulfat aus gepaarter Schwefelsäure, das allerdings augenscheinlich in keinem der Muskelversuche zur Wägung gelangte.

Wir können auf Grund unserer eigenen Versuche nicht annehmen, dafs die Muskulatur an der Bildung der Ätherschwefelsäuren nennenswert beteiligt ist. Auf die Frage, warum Kochs' Versuchergebnis von unserem abweicht, möchten wir, ohne neuerliche Versuche angestellt zu haben, nicht eingehen.

5. Nierenversuch.

Es kamen nur ein grofser Hund und eine Niere zur Verwendung. Wie schon Bunge und Schmiedeberg**) führten wir aufser in die Nierenarterie und die Nierenvene auch eine Kanüle in den Ureter ein, die bis in das Nierenbecken vorgeschoben wurde. Die Niere wurde dann mit ihrer Kapsel herausgenommen und in die feuchte Kammer von 40° gebracht. Dem Blute (etwa 1000 ccm) wurde 0,1 g Phenol und 0,3 g Natriumsulfat hinzugefügt. Der im Anfang der Durchblutung erforderliche Druck betrug 80 mm, später trat auch bei hohen Drucken (bis 200 mm) das Blut nur tropfenweise und stets hochgradig venös aus der Vene. Die Durchblutungsdauer betrug $3^1/_2$ Stunden, das Gewicht der Niere nach der Durchblutung 92 g; die Menge des zur Verarbeitung gelangenden Blutes 750 ccm. Niere und Blut wurden für sich in der oben beschriebenen Weise behandelt. Das freie Phenol wurde bis zum Verschwinden der Millonschen Reaktion abdestilliert.

In dem Nierenextrakt liefs sich weder Phenol noch Schwefelsäure aus gepaarten Verbindungen nachweisen. Aus dem bei der Durchleitung benutzten Blute wurde dagegen ein zwar unerheblicher, aber doch ganz deutlicher Niederschlag von Bromtribromphenol aus gepaarten Verbindungen gewonnen.

---

*) Kochs, Pflügers Archiv 23, 167.

**) Bunge und Schmiedeberg, Archiv f. exp. Pathologie und Pharmakologie 6, 233.

In der mit Salzsäure versetzten Flüssigkeit trat ebenfalls ein Niederschlag auf, den wir nach seinem ganzen Verhalten für Baryumsulfat halten mufsten; er erwies sich leider als unwägbar.

Christiani und Baumann*) konnten, wie bereits oben erwähnt, in einem gemeinschaftlich mit Herter an der Niere angestellten Durchleitungsversuche in dem verwendeten Blute Phenolschwefelsäure nicht nachweisen.

Kochs**) erhielt in einem Versuch, den er mit Nierenbrei und Blut anstellte, „mit völliger Sicherheit Tribromphenolkrystalle und schwefelsauren Baryt aus Phenolschwefelsäure".

Ein ganz analoges Resultat hatte er bei zwei weiteren Versuchen mit Brenzkatechin und Hydrochinon***). Bei dem Brenzkatechinversuch konnte er das schwefelsaure Baryum durch Aufschliefsen mit kohlensaurem Natrium und nochmaliges Fällen mit Chlorbaryum sicherstellen.

6. Lungenversuch.

Es kamen zwei Hunde zur Verwendung, der kleinere davon lieferte die Lungen.

Die Technik war kurz folgende: Unmittelbar nach der Entblutung aus beiden Karotiden wurde die Trachea freigelegt, eine Glaskanüle eingebunden, und alsdann nach breiter Eröffnung des Thorax eine Kanüle vom linken Ventrikel aus durch das Ostium atrioventriculare in den linken Vorhof vorgeschoben und hier eingebunden, die zweite Kanüle wurde vom rechten Ventrikel aus in den Sinus arteriosus der Pulmonalarterie eingeführt. Nachdem nunmehr die Trachea dicht unter dem Kehlkopf quer durchtrennt worden war, wurden die Lungen aus dem Körper entfernt und in einem weiten zylindrischen Gefäfs an der Trachea aufgehängt. Es folgte die Verbindung der Pulmonalarterienkanüle mit der Blut zuführenden, der Kanüle im linken Vorhof mit der Blut abführenden Leitung und der Tracheakanüle mit einem Handgebläse. Dem Blute wurde 0,1 g Phenol und 0,3 g Natriumsulfat beigemengt. Das unter ziemlich geringem Druck (40 mm) zugeleitete Blut durchströmte die Lungen sehr rasch, es flofs in äufserst kräftigem Strahl aus der Vorhofkanüle; gleichzeitig erfolgte die künstliche

*) Christiani und Baumann, Zeitschrift f. physiol. Chemie 2, 354.
**) Kochs, Pflügers Archiv 20, 76.
***) Kochs, Pflügers Archiv 20, 78.

Respiration der Lunge durch das Handgebläse. Im weiteren Verlaufe des Versuches trat (wahrscheinlich infolge einer Blutdrucksteigerung) eine Blutung in das Bronchiallumen auf; es wurde deshalb die Trachea unterhalb der Kanüle abgebunden, und das Blut von nun an, ebenso wie bei den früheren Versuchen, arterialisiert. (Übrigens war das aus der Vorhofskanüle austretende Blut so hell, dafs eine Arterialisierung kaum nötig war.) Im weiteren Verlaufe des Versuches war ein Druck von nur 20 mm nötig. Die Durchblutungsdauer betrug drei Stunden.

Das Blut und die (übrigens sehr blutreiche) Lunge wurde hierauf verarbeitet. Aus beiden wurde eine ganz kleine Menge Tribromphenol aus gepaarten Verbindungen erhalten und ebenso eine sehr geringe Menge eines augenscheinlich aus Baryumsulfat bestehenden Niederschlags.

7. Darmversuch.

Wiederum wurden zwei Hunde benutzt.

Bei dem kleineren wurde nach breiter Eröffnung der Bauchhöhle zunächst der Darm an der Grenze von Duodenum und Jejunum und ebenso etwa 1 m weiter abwärts doppelt unterbunden. Nunmehr wurde die Arteria mesenterica superior von der Aorta abdominalis und ebenso die entsprechende Vene von der Pfortader aus aufgesucht und in beide Gefäfse Kanülen eingebunden. Das Darmstück wurde oben und unten abgetrennt. Dann wurde das Mesenterium von den benachbarten Darmteilen ebenfalls unter vorheriger Anlegung von Ligaturen losgelöst und schliefslich an der Radix mesenterii abgeschnitten. Das Ganze wurde jetzt in die feuchte Kammer von 40° gebracht, und nach Verbindung der Kanülen die Durchblutung eingeleitet. Den bei der Durchblutung verwendeten etwa 1000 ccm Blut wurde 0,1 g Phenol und etwa ebenso viel Natriumsulfat in Lösung hinzugesetzt. Das Blut entströmte der Venenkanüle in rasch aufeinander folgenden, stark venösen Tropfen. Der anfangs bewegungslose Darm geriet etwa zehn Minuten nach Beginn der Durchblutung in die lebhaftesten Bewegungen, welche etwa $1^1/_2$ Stunden anhielten, um dann allmählich zu erlöschen. Die Durchblutungsdauer betrug drei Stunden. Eine nennenswerte Blutung nach aufsen hatte nicht stattgefunden.

Der Darm wurde nach Eröffnung und Beseitigung der in das Lumen ergossenen nicht unerheblichen Blutmenge zerhackt und ebenso wie die früher durchbluteten Organe verarbeitet. Die Menge des verarbeiteten Blutes betrug 400 ccm. (Das in den

Darm ergossene Blut wurde nicht berücksichtigt.) Weder in der Darmwand noch im Blut konnte die geringste Menge gepaarten Phenols nachgewiesen werden.

Auf Grund unserer Versuche glauben wir uns dahin aussprechen zu müssen, dafs die Leber das bei der Bildung der Ätherschwefelsäuren bei weitem in erster Linie in Betracht kommende Organ ist.

Geringe Mengen von Ätherschwefelsäure werden aber auch in der Niere und in der Lunge gebildet.

Die Muskulatur ist an der Synthese der Ätherschwefelsäuren nicht nennenswert beteiligt. Auch für den Darm konnte — bei einem allerdings vereinzelten Versuch — eine solche Beteiligung nicht nachgewiesen werden.

XXII.

Ueber die Umwandlung der Albumosen durch die Magenschleimhaut.

Von Dr. **Karl Glaessner** aus Prag*).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

So ausreichend wir über die Spaltung der Eiweifskörper durch die verschiedenen proteolytischen Fermente der Verdauungsdrüsen unterrichtet sind, so unbefriedigend ist unsere Kenntnis über den Ort der Rückverwandlung der Verdauungsprodukte der eingeführten Eiweifsstoffe zu Körpereiweifs und über die Art, in welcher dieser synthetische Prozefs vor sich geht. Der Grund dafür liegt zum Teil in der Schwierigkeit, einen solchen Vorgang in vivo zu beobachten, zum Teil in der Unmöglichkeit, aus den zertrümmerten Organen wirksame Lösungen der etwa vorhandenen, direkt oder durch reversible Wirkung proteosynthetisch wirkender Fermente in Form von Prefssäften und autolytischen Säften zu gewinnen. Die synthetische Funktion der Gewebe scheint eben, soweit sich bis jetzt überschen läfst, an die Intaktheit der Zelle geknüpft zu sein.

Durch die Arbeiten von Maly**), Plósz und Adamkiewicz***), Ellinger†) und L. Blum††) war festgestellt worden, dafs verfütterte, durch Pepsinverdauung gebildete Albumosen (Pepton im älteren Sinne) im Organismus Eiweifs völlig zu ersetzen vermögen.

*) Eine kurze Mitteilung über vorliegende im Sommersemester 1901 ausgeführte Arbeit erfolgte auf der Naturforscherversammlung in Hamburg.

**) Maly in Herrmanns Handbuch der Physiologie 5, 104: Pflügers Arch. 9, 585.

***) Pflügers Arch. 10, 536.

†) Zeitschr. f. Biologie 33, 201.

††) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 15.

Man hat hieraus mit Notwendigkeit den Schlufs gezogen, dafs der Organismus die Fähigkeit besitzt, diese Verdauungsprodukte in Körpereiweifs zurückzuverwandeln.

Wo dieser Prozefs vor sich geht, darüber herrschte lebhafte Diskussion. Schon Hoppe-Seyler*) hat die Bedeutung des Darmkanals für die Rückverwandlung des Peptons zu Eiweifs angedeutet. Er schreibt: „Da nun im Magen und durch das Pankreassekret Acidalbumin und Pepton gebildet wird, so scheint auch das eine Funktion der Epithelzellen des Darmes zu sein, diese Körper in Serumalbumin und fibrinbildende Stoffe überzuführen.“ Auch Heidenhain**) hat sich später dieser Auffassung angeschlossen. Plósz und Györgyay***) und Drosdoff†) glaubten im Pfortaderblut verdauender Tiere „Pepton“ (d. h. nicht koagulierbare, Biuretreaktion gebende Substanzen) nachweisen zu können. Daher nahmen sie eine Rückverwandlung desselben im Organismus aufserhalb des Magendarmkanals an. Schmidt-Mühlheim††) schlofs, da er weder im Venenblut, noch im Chylus verdauender Tiere Pepton nachweisen konnte, dafs dem Blute die Fähigkeit zukomme, das Pepton in Serumalbumin überzuführen. Salvioli†††) endlich konnte Albumosen („Pepton“ im älteren Sinne), die er in das Lumen eines künstlich durchbluteten Darmes gebracht hatte, im abfliefsenden Venenblute nicht wiederfinden, obgleich sie aus dem Darme sichtlich verschwanden, während dieselben, direkt ins Blut gebracht, sich in demselben nicht veränderten.

In seinen Arbeiten über das Pepton (im älteren Sinne) und die Resorption und Assimilation der Nährstoffe zeigte dann Hofmeister§), dafs Magen und Darm die einzigen Organe seien, die stets über einen beträchtlichen Peptonvorrat verfügen, und fand direkt, dafs die Rückverwandlung des Peptons zu Körpereiweifs wenigstens zum Teil im Magen erfolgt. Wurde nämlich der Magen eines Hundes, der auf der Höhe der Verdauung getötet worden war, in zwei Teile geteilt, der eine sofort in siedendes Wasser geworfen, der andere längere Zeit bei Brutwärme sich selbst über-

*) Pflügers Arch. 7, 399.
**) Daselbst 43.
***) Daselbst 10, 550.
†) Zeitschr. f. physiol. Chem. 1, 216.
††) Du Bois-Reymonds Arch. 1880, S. 46.
†††) Daselbst 1880, Suppl.-Bd. S. 112.
§) Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, 253; 5, 127; 6, 51; Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 19, 1; 20, 291; 22, 306.

lassen, so ergab sich, dafs die erste Hälfte viel mehr Pepton — dessen Menge kolorimetrisch gemessen wurde — enthielt als die zweite, ja dafs der Peptongehalt der zweiten Hälfte vollständig verschwinden konnte. In späteren Untersuchungen wies Hofmeister*) das gleiche Verhalten für die Dünndarmschleimhaut nach. Er betrachtete die Leukocyten in der Darmschleimhaut als die Vermittler der Albumosenassimilation.

Beobachtungen, welche für die Rückverwandlung der Albumosen in der Magen- und Darmmucosa sprechen, wurden dann noch von Neumeister**) beigebracht.

In neuerer Zeit ist dieses Thema nicht mehr Gegenstand der Untersuchung gewesen. Da nun aber die Methoden des Nachweises von Eiweifs und seinen Spaltungsprodukten, sowie der Trennung von Eiweifs, Albumosen und Peptonen in der letzten Zeit sich durch die Arbeiten Hofmeisters und seiner Schüler***), sodann Bömers†) viel exakter und von den älteren Anschauungen abweichend gestaltet haben, so lag es nahe, dieselben zur Klarstellung dieser wichtigen Frage zu verwerten.

Dazu kommt, dafs gegen die Beweisführung Hofmeisters auf Grund neuerer Erfahrungen ein früher nicht vorauszusehender Einwand erhoben werden kann. Die Beobachtungen über Autolyse der Organe††) beweisen die Fähigkeit überlebender bezw. abgestorbener Gewebe, Eiweifs zu nicht mehr die Biuretreaktion gebenden Produkten, also über das Stadium der „Peptone“ hinaus, zu zersetzen. Man könnte, ohne die thatsächliche Richtigkeit von Hofmeisters Befunden irgend anzufechten, doch jetzt auch zu der Anschauung gelangen, dafs das Verschwinden von „Pepton“, d. h. Biuretreaktion gebender Substanzen in Magen und Darmwand nicht auf eine Regeneration zu koagulierbarem Eiweifs, sondern auf einen Zerfall zu nicht mehr diese Reaktion gebenden Körpern zu beziehen sei.

Der Frage auf exakterem Wege näherzukommen, sind die

*) Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 19, 13.

**) Sitzungsber. d. physik.-med. Ges. zu Würzburg 1889, S. 64.

***) Kauder, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 20, 411. — Pohl, daselbst 20, 426. — Lewith, daselbst 24, 1. — E. P. Pick, Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 246. — E. Zunz, daselbst 27, 218.

†) Bömer, Zeitschr. f. analyt. Chem. 34, 562.

††) Salkowski, Virchows Arch. 147, 1898. — M. Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 135. — Siegert, Diese Beiträge 1, 114. — Conradi, daselbst 1, 136. — Hedin und Rowland, Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 341 u. 531.

nachstehend mitgeteilten, auf Veranlassung von Herrn Prof. Hofmeister ausgeführten quantitativen Untersuchungen bestimmt.

1. Methodik.

Zur Bestimmung des Peptons in Lösungen bediente man sich früher der kolorimetrischen und polarimetrischen Methode. Hier ist nicht der Ort, die Vorteile und Nachteile dieser Methoden zu erörtern. Es sei nur bemerkt, dafs die vorliegenden Versuche so angestellt wurden, dafs zur Bestimmung der vorhandenen Spaltungsprodukte des Eiweifses der Stickstoffgehalt der Flüssigkeit nach Enteiweifsung und nach dem fraktionierten Aussalzen mittels Zinksulfats [Bömer*), Zunz**)] ermittelt wurde.

Die Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt: Es wurde eine Anzahl von Hunden mit einem bestimmten Quantum Fleisch gefüttert, dann nach einer bestimmten Zeit und zwar stets durch Verblutenlassen aus beiden Karotiden getötet. Der sofort herausgenommene Magen wurde vom Inhalt sorgfältig befreit, die Schleimhaut rasch abpräpariert und längs der beiden Magenkurvaturen in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte (A) wurde gewogen, zerkleinert und für eine halbe Stunde in eine bestimmte Menge am Rückflufskühler kochender 1proz. saurer Natriumphosphatlösung gebracht. Die andere Hälfte (B) wurde ebenfalls gewogen und dann in eine feuchte Kammer gebracht, wo sie bei 40° drei Stunden verblieb. Nach dieser Zeit wurde sie zerkleinert und ebenso wie die erste Hälfte behandelt.

Die Lösung von saurem Natriumphosphat wurde verwendet, um in dieser salzhaltigen schwach sauren Lösung alles Eiweifs zu koagulieren, zugleich das in der Magenschleimhaut reichlich vorhandene Mucin zu fällen. Das halbstündige Kochen ist unter diesen Verhältnissen nicht im stande, Kollagen in Leim überzuführen, worauf bei längerem Kochen Rücksicht genommen werden müfste.

Nach dem Abkühlen wurde das Volumen von Flüssigkeit und Niederschlag genau bestimmt, ein aliquoter Teil davon abgemessen, mit dem halben Volumen gesättigter 2Prozent Schwefelsäure enthaltender Zinksulfatlösung versetzt. Es entstand ein Niederschlag, der aus Zinkphosphat bestand und die Reste von unkoaguliertem Eiweifs, von Mucin und Globin mitrifs. Das klare Filtrat (A_1, B_1) zeigte alle Albumosenreaktionen.

*) Zeitschr. f. analyt. Chem. 34, 562.
**) Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 218.

Globin wird schon bei Drittel-Sättigung mit Zinksulfat vollständig ausgefällt, wie ich mich an einem nach Schulz*) hergestellten Präparate überzeugen konnte.

Auffallend war die starke Molisch-Reaktion sowie das regelmäfsige Vorhandensein der Pentosenreaktion (Orcin- und Phloroglucinprobe). Letztere scheint eine manchen Albumosen allgemein zukommende Reaktion zu sein, was in den bisherigen Untersuchungen nicht berücksichtigt erscheint.

Die einmal versuchte Trennung der einzelnen Albumosen nach Zunz ergab, dafs die sekundären Albumosen, und zwar die von E. P. Pick als B-Albumosen bezeichnete Fraktion, weitaus überwogen, ein Umstand, der angesichts der neuerdings publizierten Arbeit von Kurajeff**) beachtenswert ist.

Es wurde nun im Filtrat A_I und B_I der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt und in Prozenten auf das Gewicht der frischen Schleimhaut berechnet. Ein bestimmter Teil des Filtrats wurde abgemessen und mit feingepulvertem, reinstem Zinksulfat in der von Zunz beschriebenen Weise gesättigt, um alle Albumosen zur Ausfällung zu bringen. Nach fünf- bis achttägigem Stehen in der Kälte hatte sich der dickflockige Niederschlag abgesetzt, der abfiltriert und mit gesättigter Zinksulfatlösung gewaschen wurde. Das klare Filtrat wurde gemessen und ein entsprechendes Volumen wieder zur Stickstoffbestimmung verwendet (Filtrat A_{II}, B_{II}). Der so erhaltene Stickstoffwert ergab die Menge des nicht aussalzbaren stickstoffhaltigen Materials und die Differenz zwischen dem Stickstoff von A_I bezw. B_I und dem Stickstoff von A_{II} bezw. B_{II} den auf Albumosen entfallenden Stickstoff.

Es hätte nun weiter das Filtrat $A_{II} B_{II}$ mit Phosphorwolframsäure ausgefällt werden können, um den Stickstoffwert der Peptone und etwa vorhandenen basischen Produkte zu erhalten. Allein dies hätte nicht mehr mit derselben Genauigkeit geschehen können und aufserdem zeigte sich, dafs die durch die Digestion bedingten Verschiedenheiten sich fast ausschliefslich auf die Albumosen bezogen.

Zum Schlufs sei bemerkt, dafs alle Stickstoffbestimmungen doppelt ausgeführt wurden und dafs alle bei der Verarbeitung verwendeten Reagentien, wie durch Blindversuche festgestellt wurde, stickstofffrei waren.

*) Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 449.

**) Diese Beiträge 1, 121.

2. Versuche.

Versuch 1. Ein mittelgrofser Hund erhält um 9 Uhr früh 1000 g feingehacktes Pferdefleisch. Das Tier wird um 12 Uhr durch Verblutenlassen aus beiden Karotiden in Äthernarkose getötet. Der Magen ist von unverdauten Fleischmassen gefüllt, der Mageninhalt reagiert stark sauer. Die Magenschleimhaut wird in der oben beschriebenen Weise bearbeitet. Gewicht der Hälfte A = 26 g, der Hälfte B = 25 g:

N-Gehalt	des	Filtrats	A_I	= 0,5512	Proz.
„	„	„	B_I	= 0,5356	„
„	„	„	A_{II}	= 0,3255	„
„	„	„	B_{II}	= 0,3248	„
Albumosen-N	von		A	= 0,2257	„
„	„		B	= 0,2264	„

Versuch 2. Ein grofser Hund erhält um 8 Uhr früh 1000 g Fleisch; getötet um 12 Uhr 30 Min.; Magen des Tieres voll; zum Teil verdauter Mageninhalt, stark sauer reagierend. Gewicht von A = 80 g, von B = 80 g:

N-Gehalt	des	Filtrats	A_I	= 0,6426	Proz.
„	„	„	B_I	= 0,5008	„
„	„	„	A_{II}	= 0,3210	„
„	„	„	B_{II}	= 0,3213	„
Albumosen-N	von		A	= 0,3216	„
„	„		B	= 0,1795	„

Versuch 3. Ein grofser Hund erhält um 10 Uhr vormittags 1000 g Fleisch; getötet um 3 Uhr 30 Min. nachmittags; Magen voll; zum Teil verdauter Mageninhalt. A = 80 g, B = 82 g:

N-Gehalt	von	A_I	= 0,8957	Proz.
„	„	B_I	= 0,4528	„
„	„	A_{II}	= 0,3311	„
„	„	B_{II}	= 0,3072	„
Albumosen-N	„	A	= 0,5646	„
„	„	B	= 0,1466	„

Versuch 4. Sehr grofser Hund; erhält um 10 Uhr vormittags 1000 g Fleisch; getötet um 4 Uhr nachmittags; Magen voll; zum gröfseren Teil verdauter Mageninhalt. Gewicht von A = 102 g, von B = 100 g:

N-Gehalt	von	A_I	= 0,6944	Proz.
„	„	B_I	= 0,4234	„
„	„	A_{II}	= 0,3671	„
„	„	B_{II}	= 0,3442	„
Albumosen-N	„	A	= 0,3273	„
„	„	B	= 0,0792	„

Versuch 5. Kleiner Hund; erhält um 10 Uhr vormittags 500 g Fleisch; getötet um 4 Uhr 30 Min. nachmittags; Magen voll, auf der Höhe der Verdauung. Gewicht von A = 32 g, von B = 30 g:

N-Gehalt	von	A_I	= 0,7390	Proz.
„	„	B_I	= 0,4618	„
„	„	A_{II}	= 0,3989	„
„	„	B_{II}	= 0,3575	„
Albumosen-N	„	A	= 0,3401	„
„	„	B	= 0,1043	„

Versuch 6. Mittelgroßer Hund; erhält um 7 Uhr früh 1000 g Fleisch, wird um 3 Uhr nachmittags getötet; Magen leer bis auf Reste. Gewicht von A = 63 g, von B = 60 g.

N-Gehalt	von	A_I	= 0,4152	Proz.
„	„	B_I	= 0,3950	„
„	„	A_{II}	= 0,3042	„
„	„	B_{II}	= 0,3126	„
Albumosen-N	„	A	= 0,1110	„
„	„	B	= 0,0824	„

Versuch 7. Großer Hund; erhält um 9 Uhr abends 1000 g Fleisch, wird um 8 Uhr früh getötet; Magen leer. Gewicht A = 80 g, von B = 80 g:

N-Gehalt	von	A_I	= 0,5016	Proz.
„	„	B_I	= 0,4754	„
„	„	A_{II}	= 0,3244	„
„	„	B_{II}	= 0,3202	„
Albumosen-N	„	A	= 0,1772	„
„	„	B	= 0,1552	„

Versuch 8. Mittelgroßer Hund; erhält um 8 Uhr abends 500 g Fleisch; wird um 10 Uhr vormittags getötet; Magen leer. Gewicht von A = 50 g, von B = 50 g.

N-Gehalt	von	A_I	= 0,6084	Proz.
„	„	B_I	= 0,5819	„
„	„	A_{II}	= 0,3489	„
„	„	B_{II}	= 0,3014	„
Albumosen-N	„	A	= 0,2595	„
„	„	B	= 0,2805	„

3. Ergebnisse.

Fasse ich die Ergebnisse der angeführten Versuche kurz zusammen, so ergiebt sich folgende Übersicht:

Versuchsnummer	Zeit nach der Verfütterung	Gewicht von		Stickstoffgehalt in Prozenten berechnet auf das Schleimhautgewicht				Albumosenstickstoff		Rückverwandelt
		A g	B g	A_I Proz.	B_I Proz.	A_{II} Proz.	B_{II} Proz.	$A_I - A_{II}$ Proz.	$B_I - B_{II}$ Proz.	Proz.
1	3 h	26	25	0,5512	0,5356	0,3255	0,3248	0,2257	0,2264	—
2	4 h 30′	80	80	0,6426	0,5008	0,3210	0,3213	0,3216	0,1795	0,1421
3	5 30	80	82	0,8957	0,4528	0,3311	0,3072	0,5646	0,1466	0,4180
4	6	102	100	0,6944	0,4234	0,3671	0,3442	0,3273	0,0792	0,2481
5	6 30	32	30	0,7390	0,4618	0,3989	0,3575	0,3401	0,1043	0,2358
6	8	63	60	0,4152	0,3950	0,3042	0,3126	0,1110	0,0824	0,0286
7	11	80	80	0,5016	0,4754	0,3244	0,3202	0,1772	0,1552	0,0220
8	14	50	50	0,6084	0,5819	0,3489	0,3014	0,2595	0,2805	—

Wird nun der Albumosenstickstoff der Hälfte A, also $A_I - A_{II}$ = 100 Proz. angenommen, so ergeben sich folgende Verhältnisse:

Versuchsnummer	Zeit der Verdauung	Albumosenstickstoff		Rückverwandelt
		$A_I - A_{II}$ Proz.	$B_I - B_{II}$ Proz.	Proz.
1	3 h	100	100,31	—
2	4 h 30′	100	55,81	44,19
3	5 30	100	25,07	74,93
4	6	100	24.19	75,81
5	6 30	100	30,66	69,34
6	8	100	74,23	25,77
7	11	100	88,95	11,05
8	14	100	108,09	—

Aus den angeführten Tabellen ist vor allem ersichtlich, dafs der Stickstoffgehalt der nicht koagulabeln Stoffe der Magenschleimhaut ein überraschend hoher genannt werden mufs. Bemerkenswert ist ferner, dafs die Menge der Albumosen aufserordentlich variiert, während die der nicht aussalzbaren stickstoffhaltigen Produkte nahezu in allen Versuchen konstant bleibt. Ferner sieht man, dafs bei der Digestion ein sehr erheblicher Teil der nicht koagulabeln, aber durch Zinksulfat fällbaren, den Albumosen entsprechenden Substanz verschwindet. Dieses Verschwinden kann aber nicht auf eine Umwandlung in weitere, nicht mehr durch Zinksulfat fällbare Abbauprodukte bedingt sein

sonst müfste der Stickstoffgehalt der durch Zinksulfat nicht fällbaren Stoffe zunehmen.

Es ist sonach jetzt einerseits durch Hofmeister nachgewiesen, dafs die überlebende Schleimhaut des Magens und Darmes Biuretreaktion gebende Stoffe in solche überführt, welche diese Reaktion nicht mehr geben, andererseits durch vorliegende Versuche, dafs dabei gelöste stickstoffhaltige Stoffe von der Fällbarkeit der Albumosen in koagulable oder ungelöste oder durch Zinksulfat wie Acidalbumin fällbare Substanzen übergehen. Obgleich die Natur dieser Umwandlungprodukte, ob es sich nun um Albumin, Globulin, Nukleoproteïd oder einen anderen Körper handelt, damit noch nicht bestimmt ist, so kann doch beim Zusammenhalten aller Thatsachen und der funktionellen Bedeutung des Magen-Darmkanals kaum ein Zweifel bestehen, dafs das Verschwinden der Albumosen einem regenerativen Vorgang entspricht. Eine jede andere Deutung macht dem gegenüber den Eindruck des Gezwungenen.

Sehr deutlich zeigt sich auch die Übereinstimmung zwischen Zeitdauer der Verdauung und Vermehrung der Albumosen einerseits, der Gröfse der Rückverwandlung andererseits. In der fünften bis sechsten Stunde hat der Prozefs der Rückverwandlung der Albumosen in der Magenschleimhaut seinen Höhepunkt erreicht, um dann wieder abzusinken.

Es ergeben sich aus dem Besprochenen folgende nächstliegende Schlufsfolgerungen:

1. In der Magenschleimhaut findet eine Rückverwandlung der Spaltungsprodukte des Eiweifses statt.

2. Diese Rückverwandlung bezieht sich ausschliefslich auf die Albumosen.

3. Die Rückverwandlung der Eiweifsverdauungsprodukte beginnt beim Hund bald nach Beginn der Verdauung und erreicht ihren Höhepunkt in der fünften bis sechsten Stunde, um dann allmählich abzusinken.

4. Besteht eine Beziehung der Eiweifsrückbildung zum Labferment?

Da der geschilderte Vorgang, der sich nur in der intakten Schleimhaut vollzieht, durch Erhitzen aufgehoben wird, darf man ihn als einen fermentativen ansehen und die Anwesenheit eines proteosynthetischen Ferments in der Magenschleimhaut vermuten, welches aber nur in dem intakten Gewebe seine Wirksamkeit entfalten

kann. Ein solches glauben nun in jüngster Zeit einige russische Autoren im Labferment gefunden zu haben.

Nachdem Danilevsky schon im Jahre 1886 berichtet hatte, dafs es ihm gelungen sei, mittels Lab in Peptonlösungen einen Niederschlag zu erzeugen, ist dieses Thema Gegenstand mehrerer Untersuchungen gewesen. Okunew*) wies darauf hin, dafs diese Wirkung nicht einem dem Lab beigemengten Ferment zuzuschreiben sei, sondern dem Lab selbst zukomme. Etwas eingeschränkt wurde diese Auffassung von Lawrow**), der nachwies, dafs nur bestimmte Verdauungsprodukte durch Lab koaguliert würden. In allerjüngster Zeit sind es namentlich die Arbeiten von Sawjalow***) und Kurajeff†), die sich eingehender mit diesem eigenartigen Phänomen befafst haben. Ersterer fand, dafs diese koagulierende Wirkung des Labs am besten bei saurer Reaktion und unter Zusatz von Kalksalzen eintrete, ferner, dafs das Produkt dieser Wirkung, das „Plastein", ein Eiweifskörper sui generis sei, der sich von anderen Eiweifskörpern wesentlich unterscheidet; endlich dafs es hauptsächlich Proto- und Hetero-, nicht aber Deuteroalbumosen seien, die vom Lab angegriffen würden. Kurajeff prüfte die Wirkung des Papayotins auf Peptonlösungen. Er kam zu ähnlichen Schlüssen wie Sawjalow für das Labferment. In einem wesentlichen Punkte unterscheiden sich aber die Ergebnisse der beiden Autoren. Während Sawjalow aus Deuteroalbumosen kein Plastein gewinnen konnte, fand Kurajeff gerade in den sekundären Albumosen das günstigste Material zur Darstellung des Papayotin-Plasteins, das bei Pepsin- oder Papayotinverdauung wiederum sekundäre Albumosen lieferte.

So aufserordentlich interessant diese thatsächlichen Befunde sind, so kann ich doch nicht umhin, dem Bedenken Ausdruck zu geben, dafs die vorgeführten Thatsachen nicht die Vermutung rechtfertigen, das Labferment sei bei der Regeneration der Eiweifsalbumosen im Magen und Darm beteiligt.

Vor allem ist noch nicht bewiesen, dafs sich eine solche Plasteinbildung im lebenden Körper so vollzieht, wie in vitro. Ferner ist auffallend, dafs z. B. Sawjalow unter den günstigsten Bedingungen nur etwa 17 Proz. des vorhandenen Peptons in

*) Dissertation St. Petersburg 1895.
) Zeitschr. f. physiol. Chem. **26, 513 (1898).
***) Pflügers Arch. **85**, 171 (1901).
†) Diese Beiträge, Heft 3/4, S. 121.

Plastein umwandeln konnte. Drittens ist, wenn man annimmt, dafs diese Prozesse in den Zellen der Magenschleimhaut stattfinden, zu bedenken, dafs in denselben kein Lab, sondern Prochymosin, die Vorstufe des Labs, vorhanden ist, deren synthetische Wirksamkeit erst zu erweisen wäre. Ferner findet in der Darmmucosa derselbe assimilativ-synthetische Vorgang statt, während das Labferment oder seine Vorstufe nach älteren und meinen eigenen Erfahrungen darin fehlt. Endlich ist das Plastein ein Körper, der im Organismus normalerweise nicht vorkommt, und man müfste daher zu der gezwungenen Annahme greifen, dafs erst ein zweiter fermentativer Prozefs das durch das Labferment gebildete Plastein in einen dem Organismus adäquaten Eiweifskörper umwandelt.

Bleibt auch die Frage nach der Art des Rückbildungsvorganges vorläufig unentschieden, so hat doch die Vorstellung, dafs die Magenschleimhaut die Fähigkeit der Eiweifssynthese besitzt, jedenfalls durch meine Versuche sehr an Sicherheit gewonnen. Meine nächste Aufgabe wird es sein, die analogen Vorgänge im Darm in ähnlicher Weise einer Prüfung zu unterziehen.

Prag, im September 1901.

XXIII.

Zur Kenntnis der aromatischen Gruppe im Eiweifsmolekül.

Von Dr. **Virgilio Ducceschi,**

Privatdozent und Assistent für Physiologie in Rom.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg *).

1.

Unter den aromatischen Verbindungen, von denen man voraussetzt, dafs sie als Elementargruppen an dem Aufbau des Eiweifsmoleküls beteiligt sind, nimmt das Tyrosin seit langem eine hervorragende Stellung ein. Betreffs anderer Verbindungen derselben Reihe, welche bei künstlicher oder physiologischer Eiweifsspaltung erhalten werden, z. B. der Oxysäuren und der Benzoesäure, liefs die Thatsache, dafs sie unter Bedingungen entstehen, die von einer einfachen Hydrolyse weit abweichen, so bei energischer Oxydation, durch Fäulnis oder durch physiologische Thätigkeit höherer Organismen, ihre Präexistenz im Eiweifsmolekül wenig wahrscheinlich erscheinen, zumal bei einigen dieser Verbindungen, so bei den Oxysäuren, deren Abstammung vom Tyrosin direkt bewiesen, bei anderen wenigstens nicht sicher ausgeschlossen werden konnte.

Demgegenüber kann für das Phenylalanin, welches von E. Schulze **) in Verbindung mit Barbieri und Bosshard

*) Die mitzuteilenden Befunde entstammen zum gröfseren Teil einer in Strafsburg begonnenen Studie über die Kerne des Eiweifsmoleküls; ein kleinerer Teil der Untersuchung wurde im physiologischen Institut der k. Universität Rom durchgeführt. Eine kurze Mitteilung der Resultate erfolgte auf dem V. internationalen Kongrefs für Physiologie in Turin in der Sitzung vom 19. September 1901.

**) Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 63.

durch Salzsäurespaltung aus den Eiweifskörpern der Kürbissamen dargestellt und, wenngleich mit minderer Sicherheit, auch unter den Spaltungsprodukten des Konglutins nachgewiesen wurde, eine Abstammung von der Tyrosingruppe als ausgeschlossen gelten. Versuche, dieselbe Substanz aus den Spaltungsprodukten des Kaseins und der Gelatine zu isolieren, blieben ohne Erfolg. Dafs jedoch auch hier nicht hydroxylierte aromatische Gruppen vorliegen, konnten die genannten Forscher aus dem Umstande schliefsen, dafs sie bei Oxydation dieser Proteïde mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure Benzoesäure erhielten.

Das Vorhandensein einer Phenylalaningruppe in den vegetabilischen Eiweifskörpern forderte dazu auf, sie auch in tierischen Eiweifsstoffen zu suchen, um so mehr, als anderweitige Erfahrungen ihr Vorkommen hier wahrscheinlich erscheinen liefsen.

Im Jahre 1879 fanden E. und H. Salkowski*) unter den Fäulnisprodukten der Hornsubstanz und des Serumalbumins die Phenylessigsäure, unter denen des Fibrins die Phenylpropionsäure. Durch Fäulnis von Muskelfleisch erhielten sie bald die eine, bald die andere Verbindung. Gestützt auf diese Beobachtungen und auf die Thatsache, dafs man durch Oxydation mancher Eiweifsstoffe Benzoesäure erhält, stellte Tiemann**) die Hypothese auf, in jenen Substanzen seien Monosubstitutionsprodukte des Benzols vorhanden.

Nach Bekanntwerden der Arbeiten von E. Schulze gab Baumann***) der Meinung Raum, die von E. und H. Salkowski gefundene Phenylessigsäure entstehe bei der Fäulnis aus Phenylalanin in derselben Art wie Paraoxyphenylessigsäure aus Tyrosin. Zum Beweise führte er die von ihm gefundene Thatsache an, dafs Fäulnis von Phenylalanin zur Bildung von Phenylessigsäure Anlafs giebt.

Gegen diese Vorstellung wendeten E. und H. Salkowski†) ein, es könnten auch aus dem Tyrosin bei der Fäulnis durch einen Reduktionsvorgang nichthydroxylierte aromatische Säuren entstehen. In der That erhielten sie durch faulige Zersetzung von 20 g Tyrosin 1,2 g reine Phenylpropionsäure und vermochten den von Baumann erhobenen Einwand, sie hätten ein mit Phenylalanin verunreinigtes Tyrosin verwendet, zu entkräften. Nach ihrer Ansicht hängt es nur von äufseren Umständen des Fäulnisvorganges und dem dadurch bedingten Vorhandensein oder Fehlen von Reduktionsvorgängen ab, ob sich aus Tyrosin eine hydroxylierte oder nicht hydroxylierte Säure bildet. Sie geben jedoch zu, dafs die Phenylalaningruppe den gröfseren Anteil an der Bildung der Phenylessig- und Phenylpropionsäure haben dürfte.

---

*) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **12**, 107, 648.

) Daselbst **13, 381.

***) Zeitschr. f. physiol. Chem. **7**, 285.

†) Daselbst **7**, 553.

Bei umfangreichen Untersuchungen, die Nencki*) über die aromatischen Produkte anstellte, welche bei Eiweifszersetzung durch anaërobe Mikroorganismen, so den Bac. liquefaciens magnus, Bac. spinosus und den Rauschbrandbacillus gebildet werden, wies er neben Oxyphenylpropionsäure und Skatolessigsäure beträchtliche Mengen von Phenylpropionsäure nach. Dies führte ihn zu der Vorstellung, im Eiweifs sei aufser einer Tyrosin und einer Skatolessigsäure liefernden Gruppe auch ein Phenylalaninkern enthalten, welcher, wenigstens was die Eiweifskörper des Blutserums betrifft, quantitativ am reichlichsten vertreten sei.

Phenylpropionsäure wurde ferner von Zoja**) unter den Produkten der durch Rauschbrandbacillen eingeleiteten Zersetzung des Elastins nachgewiesen. Bei anaërober Fäulnis von Leim, aus dem seit Schlieper***) durch Oxydation wiederholt Benzoesäure erhalten worden war, beobachtete Selitrenny†) reichliches Auftreten von Phenylpropionsäure, während er die entsprechende Oxysäure gänzlich vermifste.

Wenngleich die eben angeführten Befunde das Vorhandensein einer nichthydroxylierten aromatischen Gruppe wahrscheinlich machen, einen sicheren Beweis, wie ihn etwa die Säurespaltung erbringen kann, stellen sie nicht dar, da die Thätigkeit von Organismen die zunächst gebildeten Spaltungsprodukte des Eiweifses möglicherweise in noch nicht zu übersehender Weise verändert.

Auffällig ist überdies, dafs Cohn††) bei seinem Versuche, die Produkte der Kaseinspaltung quantitativ aufzuarbeiten, nicht auf Phenylalanin stiefs. Die Thatsache, dafs bei Oxydation von Eiweifs mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure Benzoesäure auftreten kann, ferner, dafs unter den durch Salpetersäureeinwirkung gewonnenen Oxydationsprodukten des Hämoglobins, Kaseins und Serumalbumins von Nencki und Sieber†††) Paranitrobenzoesäure gefunden ist, weist zwar ebenfalls auf die Präexistenz einer monosubstituirten aromatischen Gruppe hin, giebt aber keinen näheren Aufschlufs über ihre chemische Natur.

2. Darstellung von Zimtsäure aus tierischen Eiweifskörpern.

Vor kurzem hat E. Jochem§) über im hiesigen Institut ausgeführte Untersuchungen berichtet, welche die Bildung gechlorter

*) Monatsh. f. Chem. **10**, 506.
) Zeitschr. f. physiol. Chem. **23, 236.
***) Liebigs Ann. **59**, 1.
†) Monatsh. f. Chem. **10**, 908.
††) Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 395.
†††) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **18**, 394.
§) Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 119.

Fettsäuren aus Aminofettsäuren zum Gegenstande hatten. Das dabei angewandte Verfahren, Überführen der Aminosäuren in salzsaurer Lösung durch salpetrige Säure in Chlorfettsäuren, gedachte ich zum Nachweis der im Eiweifs gegebenen aliphatischen Kerne zu benutzen, indem ich es direkt auf das beim Zerkochen des Eiweifses mit Salzsäure erhaltene Gemenge von Aminosäuren anwandte und die erhaltenen Chlorfettsäuren zu den entsprechenden Fettsäuren zu reduzieren bestrebt war. Dabei erhielt ich neben anderen Substanzen, auf die hier nicht eingegangen werden soll, Zimtsäure und Fumarsäure.

Das von mir angewandte Verfahren unterschied sich von jenem Jochems im wesentlichen dadurch, dafs ich das ätherische Extrakt der Reaktionsflüssigkeit, welches die gechlorten Säuren enthält, mit metallischem Natrium reduzierte und durch Destillieren die flüchtigen und nichtflüchtigen Produkte trennte. Meine Versuche erstreckten sich auf rohes Eiereiweifs, rohes Serumeiweifs und Hornsubstanz.

Eiereiweifs. 500 g trockenes Eialbumin des Handels werden mit $1^1/_2$ Liter konzentrierter Salzsäure auf dem Sandbade fünf Stunden lang gekocht. Die abgekühlte, von gelöster und suspendierter „Melanoidinsäure" schwarz gefärbte Flüssigkeit filtriert man in eine grofse Porzellanschale und läfst mit Hilfe einer bis auf den Boden reichenden Pipette allmählich Natriumnitritlösung (325 g Nitrit in 700 g Wasser) einfliefsen, wobei man Sorge trägt, dafs die Gasentwickelung nicht zu stürmisch wird und die Temperatur 35° nicht übersteigt. Hat die Reaktion ihr Ende erreicht, so schwimmt auf der Flüssigkeit ein öliges schwarzes Harz, das mechanisch zu entfernen ist. Die Flüssigkeit wird nun unter Zurückhaltung noch vorhandenen Harzes in einen grofsen Schütteltrichter gebracht, stundenlang einem Luftstrome ausgesetzt, um die vorhandene salpetrige Säure thunlichst zu entfernen, dann mit Äther, von dem man etwa 4 Liter verwendet, gut ausgeschüttelt. Das eine rötliche Färbung zeigende ätherische Extrakt wird in einem zweiten Schütteltrichter mit Wasser gewaschen, um ihm aufgenommene Salzsäure zu entziehen, dann im Wasserbade bis auf ein Viertel des Volums abdestilliert. Den Rückstand entwässert man durch Zusatz von Phosphorpentoxyd, macht die stark saure ätherische Lösung durch Natriumalkoholat oder eine Lösung von Natriumhydroxyd in absolutem Alkohol alkalisch, wobei die hellrote Farbe der Flüssigkeit in Ziegelrot umschlägt und ein reichlicher Niederschlag auftritt, trägt dann in dieselbe allmählich im

ganzen etwa 150 g in dünne Scheiben geschnittenes Natrium*) ein. Man sorgt dafür, dafs die Flüssigkeit das Natrium stets bedeckt, sich nicht erwärmt, und dafs der verdunstende Äther durch Äther oder absoluten Alkohol ersetzt wird.

Ist die Reduktion beendigt und das Natrium völlig verbraucht, so gieſst man die Flüssigkeit in eine Schale, fügt Wasser zu und läfst den Äther verdunsten. Den Rückstand löst man in 1500 ccm Wasser, säuert mit Schwefelsäure an und destilliert im Dampfstrom, solange die übergehende Flüssigkeit saure Reaktion aufweist. Das Destillat ist grünlichgelb gefärbt, riecht scharf nach flüchtigen Fettsäuren und zeigt auf der Oberfläche ölige Tropfen oder weifsliche feste Massen. Bei Zusatz von Alkali schlägt die grünliche Farbe in Ziegelrot um, ohne dafs die suspendierte Substanz sich löst.

Der Destillationsrückstand ist eine dunkelrote Flüssigkeit, auf der eine dunkle, teerartige Substanz schwimmt. Man kühlt ab, neutralisiert bis zur schwach sauren Reaktion und läfst stehen, wobei sich das dunkle Harz auf dem Boden des Gefäfses absetzt. Man trennt es mechanisch von der Flüssigkeit. Die Zimtsäure findet sich dann zum kleinen Teil in der Flüssigkeit in Gestalt glänzender, leichter Plättchen, die sich durch Filtrieren gewinnen lassen, der gröfsere Teil wird von dem Harz eingeschlossen; die mikroskopische Untersuchung lehrt, dafs es dicht von äufserst feinen Plättchen durchsetzt ist.

Um die Zimtsäure von dem Harz zu trennen, benutzte ich zunächst die Extraktion mit Benzol; später verfuhr ich, wie folgt: Man bringt das Harz in eine Kochflasche, erhitzt mit etwa 600 ccm Wasser zum Sieden und filtriert heifs. Noch vor dem Erkalten scheidet sich die Zimtsäure in gelblichen, glänzenden Plättchen aus, die sich allmählich beim Stehen zu Boden senken. Meist genügt eine einmalige Extraktion, um die Hauptmenge der Substanz zu gewinnen. Anhaftendes Harz beseitigt man durch Umkrystallisieren aus kochendem Wasser.

Die durch öfteres Umkrystallisieren gereinigte Substanz stellt silberglänzende, äufserst leichte Plättchen vom Schmelzpunkt 131° dar, entwickelt beim weiteren Erhitzen einen scharfen, zum Husten

*) Die Reduktion mit Natrium ist möglicherweise nicht zur Gewinnung der Zimtsäure notwendig; sie verfolgte, wie bereits erwähnt, einen anderen Zweck. Ich beschreibe den Versuch, wie er von mir wiederholt ausgeführt worden ist.

reizenden Dampf und ist in kaltem Wasser unlöslich, in siedendem ziemlich, in Alkohol, Äther, Chloroform, Benzol leicht löslich.

Die Analyse ergab:

	Gefunden	Berechnet für $C_9H_8O_2$
C . . .	72,36 Proz.	72,94 Proz.
H . . .	5,64 „	5,44 „

Die Identität der Substanz wurde ferner durch deren Reaktionen sowie die Darstellung einiger Salze (Baryum-, Calcium-, Magnesium, Blei- und Kupfersalz) erhärtet.

Die Ausbeute an dem noch etwas gefärbten Produkt betrug für 500 g Eialbumin etwa $1^1/_2$ g.

2. Bluteiweifs. 500 g käufliches Präparat lieferten bei gleicher Behandlung 2,2 g etwas gefärbte, schön krystallisierte Zimtsäure.

3. Hornsubstanz. 500 g geraspeltes Horn lieferten, ebenso behandelt, etwa 0,80 g Zimtsäure.

Die für die Ausbeute gegebenen Zahlen sind gewifs zu niedrig, da bei der Untersuchung ein quantitatives Vorgehen nicht beabsichtigt und die Trennung der Zimtsäure von den harzigen Produkten sowie das weitere Reinigen mit Verlusten verbunden war. Auch hatte ich den Eindruck, dafs je nach Umständen für denselben Eiweifskörper die Ausbeute recht verschieden ausfallen kann.

3. Die Herkunft der erhaltenen Zimtsäure.

Nach dem Gesagten ist kein Zweifel möglich, dafs eine in den untersuchten Eiweifskörpern vorhandene Phenylpropangruppe zur Entstehung der Zimtsäure Veranlassung giebt. In erster Reihe konnte bei der Verbreitung des Tyrosins unter den Spaltungsprodukten der Proteide an dieses gedacht werden. Nun hat schon Jochem*) gefunden, dafs das Tyrosin bei Behandlung mit salpetriger Säure in salzsaurer Lösung nicht die erwartete Oxyphenylchlorpropionsäure liefert, sondern andere, anscheinend nitrierte Produkte bildet. Nach meinen Erfahrungen**) handelt es sich dabei um unbeständige, leicht verharzende Stoffe, die in ihren Eigenschaften weit von der Zimtsäure abstehen.

Trotz der Unwahrscheinlichkeit, dafs das Tyrosin die Muttersubstanz der Zimtsäure darstellt, habe ich, um jeden Zweifel auszuschliefsen, einen Vergleichsversuch mit reinem Tyrosin angestellt.

*) Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 120.

**) Rend. d. R. Accad. dei Lincei, Roma 5, 5 (1901).

Tyrosin, 3 g, wurde in 15 ccm konzentrierter Salzsäure gelöst und der Flüssigkeit allmählich die Lösung von 3 g Natriumnitrit in 10 ccm Wasser zugefügt. Die rotgefärbte Reaktionsmischung wurde ausgeäthert und die entwässerte ätherische Lösung mit metallischem Natrium reduziert. Nach Entfernung des Äthers wurde der Rückstand in Wasser gelöst, angesäuert und der Destillation unterworfen, wobei eine grünlichgelbe Flüssigkeit überging, die bei Natronzusatz ziegelrote Farbe annahm und auch sonst die gröfste Ähnlichkeit mit der gleichgefärbten Substanz aufwies, die ich unter analogen Verhältnissen aus Eiweifs erhalten hatte. Als Destillationsrückstand blieb eine dunkelrote Flüssigkeit und eine kleine Menge schwarzes Harz zurück, ebenfalls ähnlich dem aus Eiweifs erhaltenen. Zimtsäure liefs sich darin jedoch weder mikroskopisch, noch nach Ausziehen mit kochendem Wasser nachweisen.

Es war daher um so mehr daran zu denken, dafs das Phenylalanin die Muttersubstanz der Zimtsäure darstellt. Dem widerspricht jedoch anscheinend die Thatsache, dafs nach Jochem die Phenylaminofettsäuren genau wie die einfachen Aminofettsäuren bei dem angewandten Verfahren gechlorte Verbindungen liefern. So hatte er aus Phenylglykokoll Phenylchloressigsäure erhalten.

Nun besteht aber daneben die Möglichkeit, dafs bei der Einwirkung der salpetrigen Säure sich direkt, oder aus der gebildeten Chlorfettsäure durch Salzsäureabspaltung, die entsprechende ungesättigte Säure bildet. An diese Möglichkeit ist aber im vorliegenden Falle um so mehr zu denken, als ich einen ganz analogen Vorgang zu beobachten Gelegenheit hatte.

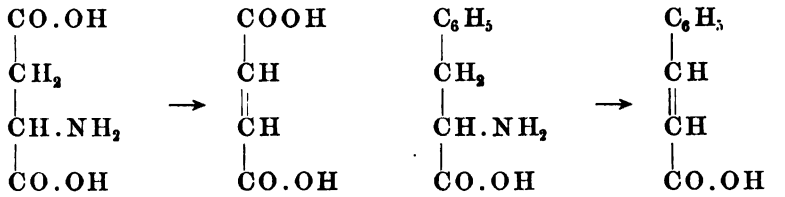
Nach Jochem entsteht aus Asparaginsäure bei Einwirkung von salpetriger Säure in salzsaurer Lösung Monochlorbernsteinsäure. Diese Säure erhielt er auch bei der entsprechenden Behandlung des durch Kochen von Eiweifs mit Salzsäure resultierenden Gemenges von Aminosäuren. Demgegenüber ist es nun beachtenswert, dafs ich bei dem obigen Versuch mit Eieralbumin auf eine merkliche Menge Fumarsäure stiefs.

Sie fand sich im Ätherextrakt der Flüssigkeit, welche nach Abdestillieren der flüchtigen Säuren verblieben war. Einige Dezigramme davon wurden leicht als saures Ammonsalz im reinsten Zustande krystallisiert erhalten:

	Gefunden	Berechnet für $C_4H_3O_4.NH_4$
C . . .	36,27 Proz.	36,05 Proz.
H . . .	5,31 „	5,27 „
N . . .	10,30 „	10,54 „

Die daraus dargestellte freie Säure hatte durchaus die Eigenschaften der Fumarsäure.

Fumarsäure ist bereits von Mühlhäuser*) unter den Produkten gefunden worden, welche bei Zersetzung von Eiweifs mit Königswasser auftreten. Da das Eiweifsmolekül regelmäfsig Asparaginsäure, aber kein anderes Derivat der Bernsteinsäure liefert, darf man die Bildung der Fumarsäure aus Asparaginsäure einerseits, der Zimtsäure aus Phenylalanin andererseits auf den gleichen Vorgang beziehen:



wobei zunächst offenbleiben mag, ob als Zwischenprodukt die gechlorte Säure auftritt oder nicht.

Da die Zimtsäure jetzt unter den aus Eieralbumin, Blutalbumin, Horn und Kasein (Spiro) erhaltenen Produkten nachgewiesen ist, kann an der weiten Verbreitung des zugehörigen Komplexes im Eiweifsmolekül, vermutlich einer Phenylalaningruppe, nicht mehr gezweifelt werden. Rom, im Juli 1901.

Nachtrag. Inzwischen ist das Phenylalanin von Emil Fischer**) aus Kasein und Eieralbumin, von L. Langstein, einer Mitteilung von Prof. Hofmeister zufolge, auch aus krystallisiertem Ovalbumin gewonnen worden, so dafs an der Richtigkeit obiger Vermutung wohl kein Zweifel besteht. Die Darstellung und Identifizierung der Zimtsäure in obiger Weise dürfte bei Untersuchungen ähnlicher Art gelegentlich als ein rasch und bequem zum Ziele führender Weg für den Nachweis von Phenylalanin von Wert sein.

*) Liebigs Ann. 101, 176.

**) Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 151, 412.

XXIV.

Die aromatische Gruppe des Leims.

Von **K. Spiro.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

Im Anschlufs an die vorstehende Mitteilung des Herrn Dr. V. Ducceschi möchte ich im folgenden kurz über gelegentliche Untersuchungen berichten, die ebenfalls auf Veranlassung von Prof. Hofmeister angestellt wurden und das Vorkommen von Phenylalanin im Leim und Kasein betreffen.

Gerade diese Stoffe wurden zur Untersuchung herangezogen, weil in ihrem Aufbau ein sehr tiefgreifender Unterschied besteht: Das Kasein, das bei der Pepsinverdauung nur Protalbumose, keine Heteroalbumose bildet, enthält reichlich Tyrosin, dagegen nur sehr wenig oder gar kein Glykokoll, während der Leim, der Heteroalbumose auch sonst ähnlich, neben sehr viel (nach Nencki 12 Proz.) Glykokoll gar kein Tyrosin enthält, auch bei der Fäulnis weder Indol noch Skatol liefert. Dafs aber im Leim der aromatische Komplex nicht ganz fehlt, haben schon A. Schlieper*) und G. Guckelberger**) wahrscheinlich gemacht, die bei der Oxydation mit Chromsäure oder mit Braunstein und Schwefelsäure daraus Benzaldehyd und Benzoesäure erhielten; dieser Befund ist auch von R. Maly***) bei seinen Versuchen über die Oxyprotsulfonsäure aus Leim bestätigt worden.

Einen Hinweis auf die Natur der im Leim enthaltenen aromatischen Substanz lieferten die Untersuchungen M. Nenckis „Über die Zersetzungen der Gelatine bei der Fäulnis mit Pan-

*) Liebigs Ann. **59**, 1.
) Daselbst **64, 39.
***) Monatsh. f. Chem. **10**, 36 (1890).

kreas." *) Ihm gelang nämlich die Auffindung einer aromatischen Base, deren Zusammensetzung nach der Analyse des Platinsalzes der Formel $C_8H_{11}N$ entspricht. Nencki erkannte sie als verschieden vom Kollidin und vermutete in ihr zunächst ein Methylphenylmethylamin resp. Isophenyläthylamin **). Als später E. Schulze ***) das Phenylalanin in den Lupinenkeimlingen sicher nachweisen und seine Anwesenheit im Kasein und auch im Leim wahrscheinlich machen konnte, faſste sie Nencki (1889) als Phenyläthylamin auf. Endlich erhielt L. Selitrenny †) bei der Zersetzung des Leims durch anaerobe Spaltpilze, die, wie sicher nachgewiesen, mit Ammoniakabspaltung und Reduktion einhergeht, Phenylpropionsäure, und zwar in so reichlicher Menge, daſs er den Gehalt des Leims an Phenylalanin auf 2 bis 3 Proz. schätzte.

Ich bin bei meinen Untersuchungen am Leim und auch am Kasein — von beiden wurden die gewöhnlichen käuflichen Präparate benutzt — bezüglich der Spaltung, Diazotierung und Ausätherung ebenso vorgegangen wie Ducceschi. Die Überführung der entstandenen chlorhaltigen Produkte in chlorfreie habe ich aber durch mehrstündiges Kochen mit alkoholischem Kali bewirkt. Nachdem dann der Alkohol abdestilliert war, wurde der Rückstand angesäuert und mit Äther extrahiert. Das ätherische Extrakt wurde in der von Ducceschi genau beschriebenen Weise verarbeitet. Es schieden sich daraus bisweilen schon beim Stehen oder beim Verreiben mit Wasser Krystalle vom Aussehen der Zimtsäure aus, die aus Wasser umkrystallisiert wurden. Die Ausbeute war beim Kasein recht gering, beim Leim wechselnd, doch lieferte mir die Verarbeitung von 2 kg Leim reichlich genug Material, um die folgenden Identifizierungsversuche anzustellen.

Die erhaltenen Zimtsäurekrystalle wurden aus heiſsem Wasser oder mit Hilfe der hochsiedenden Fraktionen des Petroleums nach den Angaben von Fittig (Lehrbuch II, S. 755) umkrystallisiert. Sehr charakteristische Krystallformen werden erhalten, wenn man nach H. Behrens ††) die Substanz mit einem Tropfen Wasser bis zur unvollständigen Lösung erwärmt. Die beim Erkalten sich ausscheidenden gegabelten Blättchen, die bei weiterem Wachstum in gebogene Spitzen auslaufen, geben ein sehr bezeichnendes

*) Festgabe für G. Valentin. Bern 1876.
**) Journ. f. prakt. Chem. 26, 47 (1882).
***) Monatsh. f. Chem. 10, 506 (1889).
†) Wiener Monatshefte 10, 908.
††) Anleitung, Heft 4, S. 92 (1897).

mikroskopisches Bild. Das gleiche Bild erhält man auch bei wiederholtem Eindampfen ammoniakalischer Zimtsäurelösung, wodurch mir das Auffinden der Säure sehr erleichtert wurde.

Die Analyse der gereinigten Substanz ergab folgende Zahlen: 0,1861 g gaben 0,4952 g CO_2 und 0,0949 g H_2O, also

gefunden	berechnet für $C_9H_8O_2$
72,57 Proz. C	72,94 Proz. C
5,70 „ H	5,44 „ H.

Zur weiteren Kennzeichnung wurde die Lösung der Säure in wasserfreiem Schwefelkohlenstoff mit einer ebensolchen Bromlösung versetzt; es entstand das Dibromid, das beim Kochen mit alkoholischem Kali neben Styrol den am Geruch leicht kenntlichen Phenylacetaldehyd lieferte. Beim Erwärmen mit verdünnter Permanganatlösung gab die in Alkali gelöste Säure deutlichen Geruch nach Benzaldehyd.

Aus diesen Befunden geht mit Sicherheit hervor, dafs es sich um Zimtsäure handelte, die wir als Abkömmling des Phenylalanins ansehen dürfen. Dieses letztere ist nach einer kurzen Notiz und freundlichen privaten Mitteilung von Herrn Professor E. Fischer inzwischen auch in dessen Laboratorium von Herrn Levene als solches aus dem Leim isoliert worden. Damit sind die von E. Schulze und M. Nencki geäufserten Vermutungen endgültig bestätigt.

Durch den Nachweis des Phenylalanins im Leim erhält auch die Vermutung Nenckis, dafs die von ihm bei der Fäulnis des Leims erhaltene Base Phenyläthylamin ist, eine neue Stütze, zumal die Bildung von Basen aus Aminosäuren durch Kohlensäureabspaltung für andere Fälle, so für die Bildung von Putrescin und Kadaverin aus Ornithin und Lysin (A. Ellinger*) sichersteht. Ein weiteres Seitenstück hierzu bildet die im hiesigen Institut von Dr. Emerson gefundene Thatsache, dafs das Paraoxyphenylalanin (Tyrosin) bei aseptischer Pankreasverdauung durch fermentative Kohlensäureabspaltung in p-Oxyphenyläthylamin verwandelt wird.

Bei Wiederholung der Nenckischen Versuche habe ich in einem von drei Versuchen eine allerdings geringe Menge einer Base erhalten**), deren Benzoylprodukt bei 114° schmolz, in

*) Zeitschr. f. physiol. Chem. 29, 334.

**) Die geringe Ausbeute kann nicht wunder nehmen, da man bei Fäulnisversuchen nicht mit einer bestimmten Spezies, sondern mit den ver-

Wasser und in Ligroin unlöslich, in Benzol und Chloroform leicht löslich war, aus Alkohol und Äther umkrystallisiert werden konnte. Diese Eigenschaften stimmen vollkommen mit denen des von A. Bischler und B. Napieralski*) beschriebenen Phenyläthylbenzamids überein. Erst in einem vierten Versuche erhielt ich genügende Quantitäten der Base, um ihre Eigenschaften mit denen reinen Phenyläthylamins, das aus Benzylcyanid dargestellt war, eingehend vergleichen zu können. Beide waren in Wasser ziemlich leicht löslich, besafsen einen Siedepunkt von 194 bis 196° C., sogen begierig Kohlensäure aus der Luft an, dabei ein blättriges Karbonat bildend. Ihr Hydrochlorat war auch in absolutem Alkohol löslich, ihr Platinsalz war in kaltem Wasser schwer, in heifsem leicht löslich, ihr Pikrat endlich krystallisierte aus Alkohol oder aus alkoholhaltigem Benzol in tetragonalen Prismen, die bei 171 bis 174° C. (korr.) schmolzen. Nach alledem ist wohl kein Zweifel mehr möglich, dafs die Nenckische Base als Phenyläthylamin anzusehen ist.

Basen von der Zusammensetzung $C_8H_{11}N$ sind überdies von Oechsner**) bei der Fäulnis von Fischfleisch und von Emmerling***) bei der Einwirkung von Streptokokken auf Fibrin erhalten worden. Die Eigenschaften derselben weichen aber in einzelnen Punkten so weit von jenen des Phenyläthylamins ab, dafs die sich aufdrängende Frage, ob es sich hier nicht überall um dieselbe Substanz handelt, vorläufig, solange keine aufklärende Untersuchung vorliegt, unbeantwortet bleiben mufs.

---

schiedensten Arten von Fäulniserregern arbeitet. Auch hat Selitrenny (s. oben) gezeigt, wie leicht Phenylalanin durch Bakterien in Phenylpropionsäure übergeführt wird, aus der natürlich kein Phenyläthylamin mehr entstehen kann.

*) Berl. Ber. **26** [2] 1903.

) Journ. of the chem. soc. **54, 730, 1118.

***) Berl. Ber. **30** [2] 1865.

XXV.

Zur Kenntnis der Immunkörper.

Erste Mitteilung.

Versuche zur Isolierung von Immunkörpern des Blutserums.

Von Dr. **Ernst P. Pick.**

[Aus dem k. k. serotherapeutischen Institut zu Wien (Vorstand: Prof. Dr. R. Paltauf) und dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolfstiftung" (Vorstand: Dr. E. Freund).]

1.

Die grofsen Fortschritte, welche in den letzten Jahren die Lehre von der Immunität erzielt hat, haben der Behandlung einiger physiologischer Probleme eine solche Förderung gebracht wie kaum früher andere der Pathologie entstammende Beobachtungen. Die Lehre vom Blute und die damit innig verbundene Lehre von den Blutgiften hat einen ungeahnten Ausbau erhalten. Vor allem sind es die neu geschaffenen biologischen Untersuchungsmethoden und der Nachweis der scharf umschriebenen, spezifischen Wirkungsweise von Immunsubstanzen auch nicht bakteriellen Ursprunges, welche es gestatten, mit gröfserer Exaktheit und Sicherheit, als es bisher mit Hilfe der chemischen und physikalischen Methoden möglich war, die verschiedensten biologischen Probleme in Angriff zu nehmen. Ich erinnere da nur an die Befunde, welche die aufserordentliche Mannigfaltigkeit physiologischer Funktionen an Substraten zeigen, die bisher funktionell als einheitlich angesehen worden sind, so an die Arbeiten, die wir Ehrlich[1])*) und seinen Schülern verdanken, weiter an Versuche, anscheinend identische Stoffe verschiedener Tiergattungen, so die Verdauungsfermente auf Grund spezifischer

*) Die angeführten Zahlen beziehen sich auf die am Schlusse der dritten Mitteilung angefügten Litteraturangaben.

Serumreaktionen zu unterscheiden, wie dies Landsteiner[2]), ähnlich den Labversuchen Morgenroths[3]), unternommen hat, ferner an die Versuche von Dungerns[4]), die Verwandtschaft einzelner Gewebsarten in Bezug auf ihre Immunkörper zu ergründen. Ich erinnere ferner an Arbeiten, wie die von Ransom[5]), mit Hilfe spezifisch wirkender Körper, des Tetanustoxins und Tetanusantitoxins, die zwischen Blut- und Lymphkreislauf stattfindenden Beziehungen zu studieren, wie solche in analoger Weise Halban[6]) zwischen mütterlichem und fötalem Kreislauf durch das Studium normaler Agglutinine feststellen konnte, und nicht zuletzt an Ehrlichs[7]) klassische Ammenversuche der Antitoxinübertragung. Nicht unerwähnt mögen auch bleiben die neuerdings zahlreich gemachten Beobachtungen, dafs einander entsprechende Eiweifskörper verschiedener Tierarten, als Immunsubstanzen verwendet, in verschiedener Weise aufeinander reagieren.

Diesen letzteren Thatsachen soll um so mehr Beachtung geschenkt werden, als im Laufe vorliegender Untersuchungen neben einer möglichst erschöpfenden Charakteristik des einen oder anderen in gröfserer Menge zur Verfügung stehenden Immunkörpers sich der Anlafs ergeben hat, das Verhalten der isolierten spezifischen Eiweifskörper des Blutserums immunisierter Tiere verschiedener Spezies in Bezug auf ihre physiologische Gleichwertigkeit zu prüfen. Bot doch gerade die Möglichkeit, mit Substanzen arbeiten zu können, denen im Tierkörper als Ausdruck der infolge der Immunisierung hervorgerufenen Stoffwechselvorgänge ein spezifisches Merkmal aufgeprägt worden war, Gelegenheit, in dem gegebenen Falle die Leistungsfähigkeit einzelner Eiweifskörper verschiedener höherer Wirbeltiere miteinander zu vergleichen. Andererseits konnte die spezifische Wirkungsweise dieser Eiweifskörper unter den vorliegenden Verhältnissen möglicherweise zum Prüfstein der Einheitlichkeit von Eiweifskörpern verwendet werden, welche aus dem normalen Blutserum bisher isoliert worden waren, zumal für die Charakterisierung dieser komplexen Verbindungen, soweit nicht durch Krystallisationsfähigkeit der Beweis der Einheitlichkeit erbracht worden ist, hauptsächlich weniger eindeutige physikalische Eigenschaften in Betracht kommen. So hatte auch Ehrlich in seinen bahnbrechenden Versuchen über Abrin und Ricinimmunität nur auf dem Wege des biologischen Experiments erkannt, dafs die beiden bis dahin als identisch angesehenen Pflanzengifte als verschiedene Substanzen anzusprechen seien. Auch hier waren bezüglich der Eiweifskörper ähnliche Ziele angestrebt worden

und es mögen auch dem zeitlichen Verlauf der Untersuchungen entsprechend die diesen Teil der Arbeit berührenden Versuche hier zunächst angeführt werden.

Allerdings war es bis jetzt vielfach die Labilität der bisweilen an die Wirkung der Enzyme erinnernden Immunsubstanzen, welche besonders dem Studium ihres chemischen Aufbaues unüberwindliche Schwierigkeiten bot und auch der Durchführung einer nur einigermafsen zufriedenstellenden chemischen Charakteristik im Wege stand. Denn die verschiedensten der organischen Chemie entnommenen Reinigungsmethoden, wie sie zum erstenmal in ausgedehntem Mafse Brieger[10]) bei der Darstellung des Diphtherie- und Tetanusantitoxins anwandte, erwiesen sich zur Isolierung eines physiologisch vollwertigen Körpers nur wenig zweckdienlich; dagegen hatten wiederum auf physikalischem Wege wirkende Agentien, wie die Lösungen der Neutralsalze, den Nachteil, nur einen geringen Teil der anhaftenden Verunreinigungen, so der fremdartigen Eiweifskörper, zu entfernen. Ebenso war es auch Buchner[12]), der bei seinen grundlegenden Untersuchungen über bakterizide und globulizide Eigenschaften des Serums die Wirkung der Neutralsalze genau geprüft hatte, selbst durch partielle Salzfällungen, wie auch den späteren Autoren nicht möglich gewesen, auf diese Weise eine Isolierung der aktiven Stoffe zu erreichen.

Bei Beginn der nachfolgenden Untersuchungen (im Monat Juni 1899), die sich einer fortlaufenden Reihe von Arbeiten anschlossen, welche im hiesigen Institute und dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolfstiftung" über die chemische Natur der Antitoxine und Agglutinine ausgeführt worden waren, war behufs Isolierung von Immunkörpern in noch nicht ganz befriedigender Weise eine Methode benutzt worden, die unter Hofmeisters[17]) Leitung zur Trennung und Charakterisierung von Eiweifskörpern von seinen Schülern vielfache erfolgreiche Anwendung gefunden hat. Es war um so mehr die Anwendung dieser Methode der fraktionierten Salzfällung zur Trennung der wenig beständigen Immunkörper aus dem Serum immunisierter Tiere geboten, als sie sich gerade in der letzten Zeit bei der Isolierung von äufserst labilen Fermenten in ausgezeichneter Weise bewährt hatte und in hohem Mafse die Sicherheit bietet, die Substanzen in keiner irgendwie in Betracht kommenden Art chemisch zu beeinflussen. So konnte Raudnitz[21]) auf Grund dieses Aussalzungsverfahrens feststellen, dafs das H_2O_2 katalysierende und das die Guajaktinktur bläuende Ferment der Milch

verschiedene Körper sind, und Jacoby[22]) war es bei seinen schönen Untersuchungen über Leberfermente möglich, auf Grund derselben Methode eine scharfe Trennung des Lebertrypsins von der Aldehydase der Leber herbeizuführen. Während der Ausführung meiner Versuche, und nachdem der die Isolierung der Eiweifskörper des Diphtherieantitoxins behandelnde Teil bereits abgeschlossen war, erschien ferner eine Mitteilung von Ide und Lemaire[23]), welche mit der gleichen Methode ähnliche Resultate bei der Untersuchung von mit Diphtherietoxin immunisierten Pferden erhielten. Endlich wäre hier auch die Arbeit von Fuld und Spiro[24]) über die Trennung der labenden und labhemmenden Substanzen des Blutes, die in analoger Weise erreicht wurde, hervorzuheben.

2. Methodisches.

Die Versuchsanordnung war dort, wo gröfsere Serummengen zur Verfügung standen, dieselbe, wie sie bereits früher zur Bestimmung von Fällungsgrenzen von Albumosen aus Eiweifsverdauungsgemischen mittels gesättigter Ammonsulfatlösung angewendet worden war, und ist ohne weiteres aus den Versuchen selbst ersichtlich. Dort, wo zur Bestimmung von Fällungsgrenzen keine hinreichenden Serummengen zu Gebote standen, wurden nach den anderweitig gefundenen Fällungsgrenzen durch Fällung mit heifs gesättigter, erkalteter Ammonsulfatlösung die einzelnen Eiweifsfraktionen dargestellt und dann durch Feststellung ihrer physiologischen Wirkung geprüft, inwieweit sich diese mit den isolierten Eiweifsfraktionen deckt. Dabei ergab sich vielfach, wie dies auch Ide und Lemaire betonen, die Notwendigkeit, die durch Salzfällung erhaltenen Niederschläge wiederholt durch Lösen in destilliertem Wasser und fraktionierte Fällung mit gesättigter Ammonsulfatlösung zu reinigen. Da es hauptsächlich auf die Bestimmung der Immunkörper-Verteilung ankam, ist selbstverständlich, dafs bei diesem Vorgehen sorgfältig jeder Verlust an Substanz vermieden werden und auch das Verhältnis des Endvolumens der zu prüfenden Lösungen zu der Ausgangsmenge des angewandten Serums genau in Rechnung kommen mufste. Aus dem gleichen Grunde wurde von einer Entfernung des anhaftenden Salzes Umgang genommen, da einerseits eine solche, sei es, dafs sie durch ein chemisches Verfahren oder durch Dialyse vorgenommen worden wäre, ohne Verluste an wirksamer Substanz kaum durchführbar

gewesen wäre, andererseits der nach sorgfältigem Abpressen der erhaltenen Niederschläge zurückgebliebene, sehr geringe Salzgehalt sich nur in wenigen Fällen störend erwies, und namentlich die durch die Prüfungsmethode gebotene Verdünnung der Lösung jedweden schädlichen Einfluſs des Salzes aufhob. Nur in wenigen Fällen, wo es nötig war, gröſsere Substanzmengen unverdünnt den Versuchstieren beizubringen, wurde die Hauptmasse des Salzes durch kurz dauernde Dialyse entfernt.

Zur Untersuchung gelangten 1. Sera*) von Pferden, die mit Diphtherie-, Tetanustoxin-, abgetöteten Typhus- und Cholerakulturen immunisiert worden waren; 2. Sera von Ziegen, die mit Typhus- und Cholerakulturen sowie mit Diphtherietoxin vorbehandelt waren, und endlich 3. Kaninchen- und Meerschweinchensera von mit Typhuskulturen immunisierten Tieren.

3. Versuche mit Diphtherieantitoxin.

a) Pferdeserum.

Bei Durchsicht der vorliegenden Litteratur über das Verhältnis des Diphtherieantitoxins zu den Eiweiſskörpern, insbesondere zu dem Serumglobulin, ergab es sich, daſs die Befunde der verschiedenen Autoren je nach dem eingeschlagenen Verfahren vollkommen verschiedene waren, indem der eine Teil der Untersucher den Heilkörper mit dem Serumglobulin identifizierte, während ein anderer Teil rein dargestelltes Globulin unwirksam fand.

So fand Dieudonné[25]) Globulin, wenn es mit Kohlensäure gefällt war, unwirksam, und auch Belfanti und Carbone[27]) geben an, durch Kohlensäure- und Essigsäurefällung kein Antitoxin zu erhalten, während Magnesia- und Ammonsulfatfällung in Übereinstimmung mit den Angaben Smirnows[26]) und früherer Autoren Globulin mit quantitativer Ausbeute des Antitoxins fällt. Diese Widersprüche konnten die Untersuchungen von Freund und Sternberg[13]), Seng[14]) und E. Marcus[15]) dadurch aufklären, daſs sie zeigten, daſs auch der bei der Dialyse antitoxinhaltiger Eiweiſskörper ausfallende Anteil des Globulins (das „unlösliche Globulin“) unwirksam und zum gröſsten Teil mit dem durch Essigsäurefällung erhaltenen Niederschlage identisch sei. Es ging aus diesen Angaben hervor, daſs der bisher als

*) Für die freundliche Überlassung einer genügenden Menge der Pferdeimmunsera fühle ich mich dem Herrn Dr. Otto Jelinek zu ganz besonderem Danke verpflichtet, während ich die Möglichkeit, mit ausreichenden Mengen der Typhus- und Choleraziegenimmunsera zu arbeiten, meinem lieben Freunde Herrn Dr. Ernst Keller in Prag verdanke.

Globulin bezeichnete Körper nicht einheitlich sei, und es lag zunächst die Aufgabe vor, die Trennung dieses Körpers in den physiologisch wirksamen und unwirksamen Bestandteil durchzuführen.

Versuche, das Globulin des normalen Serums durch Aussalzung bei verschiedenem Sättigungsgrade zu zerlegen, hatte bereits Kauder[17]) mit negativem Erfolge unternommen und sie wurden in der Folge noch verschiedentlich zum Zwecke der Isolierung des Diphtherieantitoxins, jedoch ebenfalls erfolglos, angewendet. So hatte Brodie[28]) bereits im Jahre 1897 den Versuch angestellt, durch allmählichen Zusatz von Ammonsulfat unter der halben Sättigungsgrenze der Lösung mit diesem Salze vier verschiedene Eiweifsfraktionen darzustellen, die jedoch alle ungefähr die gleiche Menge der Heilsubstanz enthielten. Vor kurzem hatte auch Atkinson[29]) durch eine kombinierte Fällung mit Kochsalz und Magnesiasulfat eine solche Trennung angestrebt.

Da die Erfolglosigkeit der Versuche, den unwirksamen Teil des Globulins durch Salzfällung zu entfernen, zumeist darauf zurückzuführen war, dafs die einzelnen dargestellten Fraktionen nicht den Fällungsgrenzen der vorhandenen Eiweifskörper entsprachen, wurde durch sorgfältige Versuche, bei denen die einzelnen Fraktionen wiederholt gelöst und gefällt worden waren, zunächst festgestellt, dafs das von Reye[30]) aus normalem Pferdeserum abgeschiedene Fibrinoglobulin entsprechend einer Sättigung von 21,5 Proz. Ammonsulfat keinen Heilkörper enthält. Weitere Versuche lehrten, dafs auch ein bestimmter Teil des nun übrig bleibenden Globulins keine antitoxische Wirkung hatte und dafs sich dieser aus dem Serum noch bequem abscheiden liefs, wenn die Flüssigkeit einen Gehalt von 25,6 Proz. an Ammonsulfat enthielt (Fraktion II). Es verblieb nunmehr ein Eiweifskörper in Lösung (Fraktion III), der durch weiteres Eintragen der gesättigten Ammonsulfatlösung bis zu einem Gehalte von 38 Proz. von dem Serumalbumin (Fraktion IV) gut zu trennen ist und den Heilkörper in quantitativer Ausbeute enthält. Es gelingt also auf diese Weise, aus dem als Globulin bezeichneten Gemenge mit Sicherheit zwei Fraktionen abzuscheiden, das Fibrinoglobulin und den durch Ammonsulfateintragung zwischen 21,5 Proz. und 25,6 Proz. fällbaren Eiweifskörper, welche keine antitoxischen Eigenschaften besitzen, so dafs der bei dem nächst höheren Salzgehalt bis zur Halbsättigung fällbare Körper als alleiniger Träger des wirksamen Prinzips angesehen werden mufs. Ein ähnliches Resultat geht aus der Arbeit von Ide und Lemaire[23]) hervor.

Dieses Verfahren, das sich auch bei der Ausführung mit gröfseren Serummengen gut bewährt hat, erlaubt eine Erhöhung der Heilwirkung zu verdünnten Heilserums um das 10- bis 15fache.

Nachdem auf diese Weise die Isolierung eines Körpers oder Körpergemenges mit vollem Antitoxingehalt gelungen war, war es nötig, den Beweis zu liefern, dafs die in vorstehender Weise gefundenen Sättigungsgrenzen keine zufällige, sondern eine durch die Natur der vorhandenen Eiweifskörper bedingte sei. Zu diesem Behufe wurde aus einer gröfseren Menge Diphtherieserum mit einem etwa 70 fachen Normalwert durch Fällung mit gesättigter Ammonsulfatlösung der als Fraktion III bezeichnete Körper ausgefällt, der erhaltene Niederschlag auf ein Seidenfilter gebracht, gut abgepreſst, in Wasser gelöst und zwei Tage gegen strömendes Wasser dialysiert. Mit dieser Lösung wurde nachfolgende Versuchsreihe aufgestellt:

Die Prüfung der Lösungen auf ihren Antitoxingehalt wurde nach der im Institute üblichen Ehrlichschen[*]) Mischmethode unter Benutzung der zehnfach letalen Toxinmenge*) als Prüfungsdosis vorgenommen. Das hierbei verwendete Toxin stellte in einer Verdünnung von 0,007 ccm die für Meerschweinchen von 280 g bis 300 g Gewicht einfach tödliche Dosis dar.

Nr.	Lösung von Frakt. III	H_2O	Gesättigte Ammonsulfatlösung	Flüssigkeit nach Zusatz	Filtrat nach 24stündigem Stehen auf Zusatz von 0,2 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung	Antitoxingehalt in 0,1 ccm der Lösung	
						des Niederschlags	des Filtrats
	ccm	ccm	ccm				
1	2	5,6	2,4	Klar	—	—	—
2	2	5,2	2,8	Klar	—	—	—
3	2	4,8	3,2	Klar	—	—	—
4	2	4,4	3,6	Klar, über Nacht opal.	—	(in 0,1 ccm der gesamten Lösung 55 A.-E.)	
5	2	4,2	3,8	Dichte Trüb.	Opalesz.	10—15 A.-E.	40 A.-E.
6	2	3,8	4,2	Dichte flock. Fällung	Opalesz.	50 A.-E.	10 A.-E.
7	2	3,4	4,6	Dichte flock. Fällung	Klar	Voller Ant.-Geh.	—
8	2	3	5	Dichte flock. Fällung	Klar	—	—

Die in den Proben 4 bis 7 erhaltenen Niederschläge wurden auf kleinen Filtern quantitativ gesammelt, sorgfältig abgepreſst und der Niederschlag samt Filter wiederum in 10 ccm 0,6 proz. Kochsalzlösung gelöst, von Papierfasern abfiltriert und auf ihren Antitoxingehalt untersucht. Ebenso wurde der Antitoxingehalt der durch Filtration der Niederschläge erhaltenen Filtrate geprüft. Die Verluste an Antitoxingehalt, die bei dem Sammeln und Ab-

*) Das zu den Prüfungen nötige Toxin wurde mir in dankenswerter Weise von meinem Kollegen Herrn Dr. R. Kraus zur Verfügung gestellt.

pressen der Niederschläge kaum zu umgehen sind, bleiben so geringfügige, dafs sie nicht weiter in Rechnung kommen. Die bezüglichen Protokolle, die der Übersichtlichkeit wegen bereits teilweise in die obere Tabelle eingefügt wurden, ergaben:

Bestimmung des Antitoxingehalts der Lösung der Fraktion III.

α) Prüfungsergebnis bei Annahme eines 400fachen Antitoxingehalts.

Gewicht des Meerschweinchens: 250 g.

0,00025 ccm Frakt. III + 0,07 ccm Di. Tox.

6. XI. 1898 Injektion. 7. XI. Glatt. 8. XI. Grofses weiches Infiltrat, abends †*).

β) Prüfungsergebnis bei Annahme eines 300fachen Antitoxingehalts.

Gewicht des Meerschweinchens: 260 g.

0,00033 ccm Frakt. III + 0,07 ccm Di. Tox.

6. XI. Injektion. 7. XI. Kleines Infiltrat. 8. XI. Glatt. Tier bleibt gesund.

Bestimmung des Antitoxingehalts der Lösung der Probe 4.

α) Prüfungsergebnis bei Annahme eines 60fachen Antitoxingehalts.

Gewicht des Meerschweinchens: 180 g.

0,00166 ccm Lösung 4 + 0,07 ccm Di. Tox.

9. XI. Injektion. 10. XI. Weiches Infiltrat. 11. XI. Weiches Infiltrat. 12. XI. †, Toxintod.

β) Prüfungsergebnis bei Annahme eines 55fachen Antitoxingehalts.

Gewicht des Meerschweinchens: 260 g.

0,00182 ccm Lösung 4 + 0,07 Di. Tox.

9. XI. Injektion. 10. XI. Dünner Strang. 11. XI. Hartes Infiltrat. 12. XI. Demark. Infiltrat. 13. XI. Infiltration in Resorption. 17. XI. Glatt.

Bestimmung des Antitoxingehalts der Lösung des Niederschlags von 5.

α) Prüfungsergebnis bei Annahme eines 10fachen Antitoxingehalts.

Gewicht des Meerschweinchens: 230 g.

0,01 ccm Lösung des Niederschlags + 0,07 ccm Di. Tox.

11. XI. Injektion. Das Tier bleibt normal.

β) Prüfungsergebnis bei Annahme eines 15fachen Antitoxingehalts.

Gewicht des Meerschweinchens: 220 g.

0,0066 ccm Lösung des Niederschlags + 0,07 ccm Di. Tox.

11. XI. Injektion. 12. XI. Kleines Infiltrat. 13. XI. Weiches Infiltrat. 14. XI. Infiltrat nimmt zu. 15. XI. Dyspnoisch. 16. XI. †, Toxintod.

---

*) In allen Fällen, in welchen die Versuchstiere zu Grunde gingen, wurde durch die Sektion des Tieres die Diagnose des Toxintodes auf Grund der charakteristischen Merkmale (sulzige Infiltration, Ekchymosen, Exsudate und dunkelrothe Verfärbung der Nebennieren) sichergestellt. Für vielfache Unterstützung bei der Feststellung der Todesursache der Versuchstiere bin ich Herrn Prosektursadjunkten Dr. C. Sternberg zu warmem Danke verpflichtet.

Bestimmung des Antitoxingehalts des Filtrats vom Niederschlag 5.

α) Prüfungsergebnis bei Annahme eines 20fachen Antitoxingehalts.

Gewicht des Meerschweinchens: 190 g.

0,005 ccm Filtrat + 0,07 ccm Di. Tox.

12. XI. Injektion. 13. XI. Glatt. Tier bleibt normal.

β) Prüfungsergebnis bei Annahme eines 40fachen Antitoxingehalts.

Gewicht des Meerschweinchens: 225 g.

0,0025 ccm Filtrat + 0,07 ccm Di. Tox.

12. XI. Injektion. 13. XI. Glatt. 14. XI. Glatt. 15. XI. Harter Strang, der später resorbiert wird. Tier bleibt normal.

Bestimmung des Antitoxingehalts der Lösung des Niederschlags und des Filtrats von 6.

Prüfungsergebnis der Lösung des Niederschlags bei Annahme eines 50fachen Antitoxingehalts.

Gewicht des Meerschweinchens: 300 g.

0,002 ccm der Lösung + 0,07 ccm Di. Tox.

12. XI. Injektion. 13. XI. Harter Strang. 14. XI. Infiltrat. 15. XI. Infiltrat demarkiert. Das Infiltrat wird resorbiert, das Tier bleibt normal.

α) Prüfungsergebnis des Filtrats bei Annahme eines 5fachen Antitoxingehalts.

Gewicht des Meerschweinchens: 230 g.

0,02 ccm + 0,07 ccm Di. Tox.

12. XI. Injektion. Tier bleibt normal.

β) Prüfungsergebnis des Filtrats bei Annahme des 10fachen Antitoxingehalts.

Gewicht des Meerschweinchens: 250 g.

0,01 ccm Filtrat + 0,07 ccm Di. Tox.

12. XI. Injektion. 13. XI. Weiches Infiltrat. 14. XI. Grofses weiches Infiltrat. 15. XI. Der gleiche Befund. Das Infiltrat verhärtet, wird in den nächsten Tagen demarkiert und abgestofsen.

Bestimmung des Antitoxingehalts des Filtrats von 7.

Prüfungsergebnis bei Annahme eines 5fachen Antitoxingehalts.

0,02 ccm Filtrat + 0,07 ccm Di. Tox.

12. XI. Injektion. 13. XI. Grofses weiches Infiltrat. 14. XI. †, Toxintod.

Bestimmung des Antitoxingehalts des Albumins, das aus dem Filtrat 7 durch Salzsättigung gewonnen worden war.

Prüfungsergebnis bei Annahme eines einfachen Antitoxingehalts.

0,1 ccm der Lösung + 0,07 ccm Di. Tox.

15. XI. Injektion. 16. XI. Infiltrat. 17. XI. †, Toxintod.

Aus den hier angeführten Versuchen, bei denen schon infolge der geringen zur Verwendung gebrachten Eiweifsmengen eine

Verunreinigung durch mechanisches Anhaften ausgeschlossen erscheint, ergiebt sich mit grofser Schärfe die genaue Übereinstimmung des Antitoxinwertes mit den Fällungsgrenzen des Eiweifskörpers. Man sieht zugleich, dafs die Ausbeute an Heilwert in den auf das Fünffache verdünnten Lösungen eine vollständige war.

Da durch das Festsetzen der Fällungsgrenzen des Körpers gezeigt worden war, dafs nicht etwa unausgefällte Globulinreste in der Fraktion III vorlagen, sondern Eiweifskörper, die von den physiologisch nicht wirksamen auch in ihrem physikalischen Verhalten zu trennen waren, lag es nahe, in gleicher Weise normales Pferdeserum zu prüfen:

500 ccm Pferdeserum wurden bei nativer Reaktion mit 250 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, der Niederschlag (Ng. I) nach dem Absetzen filtriert und das Filtrat durch Zufügen von einem Drittel Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung auf eine halbe Sättigung gebracht (Ng. II). Beide Niederschläge wurden gut abgepreſst und in 500 ccm H_2O gelöst. Die Bestimmung der Fällungsgrenzen der Lösungen beider Niederschläge bestätigte vollkommen, dafs auch das Globulin des normalen Pferdeserums neben dem Fibrinoglobulin mindestens zwei voneinander verschiedene Körper enthält, von denen der eine bei einem Gehalt der Flüssigkeit von 28 bis 36 Vol.-Proz., der andere bei einem Gehalt von 36 bis 44 Vol.-Proz. an gesättigter Ammonsulfatlösung aussalzbar ist. Es erhellt aus diesem Befunde, weshalb es Kauder[17]) nicht möglich war, eine scharfe Trennung durch Ammonsulfatlösung zu finden. Da beide Körper ohne Zwischenraum in ihrem Aussalzungsvermögen ineinander übergehen, so wäre es ohne Benutzung der antitoxischen Wirkung des Eiweifskörpers als Wegweiser kaum möglich gewesen, mit diesem Salze eine Fällungsgrenze beider Körper aufzudecken. Dafs eine solche Trennung im normalen Serum auch mit anderen Salzen gelingt, hat inzwischen Spiro[24]) in Gemeinschaft mit Bruno Haake gleichzeitig mit unseren Untersuchungen zeigen können, indem er den bei der Dialyse leichter fällbaren Globulinanteil durch Kaliumacetat ausfällbar fand. Bereits Winterberg[15]) hat indes gezeigt, dafs die Ausfällung mit Kaliumacetat für die Isolierung von Immunkörpern wegen der schädlichen Einwirkung dieses Salzes (Zerstörung des Typhusagglutinins) unzweckmäfsig ist, und so haben auch später Fuld und Spiro[24]) bei der Darstellung der labenden und labhemmenden Substanz des normalen Pferdeserums die hier angewandte Methode der Salzfällung benutzt. Entsprechend der gelegentlich jener Befunde Spiros von Hofmeister gewählten

Nomenklatur wird der leichter fällbare, die charakteristischen Globulinmerkmale aufweisende Körper als Euglobulin, der erst bei Halbsättigung vollkommen aussalzbare als Pseudoglobulin bezeichnet. Da über die beiden Körper genauere Untersuchungen in Aussicht stehen, fanden ihre chemischen Eigenschaften hier keine weitere Bearbeitung.

b) Ziegenserum.

Während naturgemäfs die meisten Erfahrungen über das Verhältnis des Antitoxins zu den Eiweifskörpern den Untersuchungen des Pferdeserums entstammen, liegen über die antitoxinhaltigen Eiweifskörper des Ziegenserums keine genaueren Untersuchungen vor. Wohl aber wurden von Ehrlich und Brieger[8]) und später von Wassermann[11]) Untersuchungen über Konzentrierung antitoxischer Substanzen an der Ziegenmilch angestellt. Während die Erstgenannten sowie Brieger und Cohn[9]) an tetanusimmunen Tieren arbeiteten, experimentierte Wassermann mit dem Diphtherieantitoxin. Es ergab sich dabei die bemerkenswerte Thatsache, dafs nach Koagulation der Milch immunisierter Tiere durch Labferment in der übrigbleibenden Molke die Antistoffe hauptsächlich im ersten Anteil der Fällung, die durch 27 bis 30 Proz. Ammonsulfat erreicht wird, enthalten sind. Dieser Befund gewinnt dadurch an Interesse, dafs nach unseren bisherigen Kenntnissen das Laktoglobulin, das bei der Ausfällung hier wesentlich in Betracht kommt, alle Eigenschaften des Serumglobulins besitzt, insbesondere jene, welche das Fällungsvermögen gegenüber Neutralsalzen betreffen, so dafs es mit diesem, zumal in dem dem Paraglobulinanteil entsprechenden Euglobulin, als identisch angesehen wird. Es wäre somit in der Fällbarkeit des Pferde- und Ziegenantitoxins eine Differenz gegeben, welche bisher nur wenig Beachtung fand, in den nachfolgenden Versuchen jedoch noch prägnanter hervortritt. In einem Vorversuche wurden die Fällungsgrenzen der Globuline des normalen Ziegenserums bestimmt. Dieselben fanden sich in genauer Übereinstimmung mit denen der Pferdeglobuline, indem bei einem Gehalte von 3,4 bis 3,6 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung in 10 ccm Lösung das Euglobulin ausgefällt wurde, während die obere Fällungsgrenze des Pseudoglobulins mit der des Pferdeserum-Pseudoglobulins nämlich bei einem Gehalte von 4,2 bis 4,4 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung in 10 ccm zusammenfiel.

Zu dem nun folgenden Trennungsversuche mit Diphtherieimmunziegenserum stand mir nur ein Ziegenserum zur Verfügung, von dem 0,1 ccm eben

im stande war, die 10fache tödliche Giftmenge eines Toxins zu paralysieren, das in der Dosis von 0,0098 ccm ein Meerschweinchen von etwa 260 g in drei Tagen tötete. 20 ccm dieses Immunserums wurden gemäfs den im normalen Ziegenserum gefundenen Fällungsgrenzen bei neutraler Reaktion mit 10 ccm einer kalt gesättigten Ammonsulfatlösung gefällt, der Niederschlag nach zwei Stunden filtriert, gut abgepreſst, in 30 ccm H_2O gelöst, nochmals bei einer drittel Sättigung gefällt und der erhaltene Niederschlag nach sorgfältigem Abpressen in 20 ccm H_2O gelöst (Euglobulin). Die beiden Filtrate wurden vereinigt, durch weiteren Ammonsulfatzusatz auf eine halbe Sättigung gebracht und das reichlich sich abscheidende Pseudoglobulin nach abermaligem Lösen im ursprünglichen Volumen durch nochmalige Fällung bei Drittel- und Halb-Sättigung von den ihm anhaftenden Euglobulinresten gereinigt. Die letzteren wurden mit der Euglobulinlösung vereinigt und diese nachher einer nochmaligen Fällung mit Ammonsulfat bei Drittel-Sättigung unterzogen.

Während auch hier die Euglobulinlösung eine stark opaleszente Lösung darstellt, ist die Pseudoglobulinlösung völlig klar; Fibrinoglobulin konnte in dem zur Verwendung gebrachten Serum nicht nachgewiesen werden. Die Antitoxinverteilung in den beiden auf das Ausgangsvolumen von 20 ccm gebrachten Lösungen wird durch nachfolgende, einer gröfseren Versuchszahl entnommene Protokolle demonstriert.

Bestimmung des Antitoxingehalts des Ausgangsserums.

Prüfungsergebnis bei Annahme eines 10fachen Antitoxingehalts der Lösung.

Gewicht des Meerschweinchens: 330 g.

0,01 ccm Serum + 0,098 ccm Di. Tox.

6. VI. Injektion. 7. VI. Infiltrat. 8. VI. Grofses Infiltrat. 9. VI. Grofses weiches Infiltrat. 10. VI. Der gleiche Befund. 11. VI. Infiltrat bis in Demark. 14. VI. Haarausfall. 15. VI. Nekrose.

Bestimmung des Antitoxingehalts des Pseudoglobulins.

Prüfungsergebnis bei Annahme eines 2fachen Antitoxingehalts der Lösung.

Gewicht des Meerschweinchens: 290 g.

0,05 ccm Pseudoglobulin + 0,098 ccm Di. Tox.

8. VI. Injektion. 9. VI. Infiltrat. 10. VI. †, Toxintod.

Bestimmung des Antitoxingehalts der Euglobulinlösung.

Prüfungsergebnis bei Annahme eines 10fachen Antitoxingehalts der Lösung.

Gewicht des Meerschweinchens: 230 g.

0,01 ccm Euglobulin + 0,098 ccm Di. Tox.

5. VI. Injektion. 6. VI. Harter Strang. 7. VI. Grofses Infiltrat. 8. VI. Dyspnoe; mittags †, Toxintod.

Prüfungsergebnis bei Annahme eines 6fachen Antitoxingehalts der Lösung.

Gewicht des Meerschweinchens: 220 g.

0,017 ccm Euglobulin + 0,098 ccm Di. Tox.

7. VI. Injektion. 8. VI. Infiltrat. 9. VI. Kleines Infiltrat; Tier munter.

10 VI. Hartes Infiltrat; Tier munter. 11. VI. Infiltrat demarkiert. 12. VI. Der gleiche Befund. 13. VI. Haarausfall; Tier bleibt am Leben.

Man erkennt trotz der geringen Wertigkeit des Serums ohne weiteres, dafs hier die Verteilung des Heilkörpers eine gänzlich andere ist als beim Pferdeserum. Gerade der geringe Antitoxingehalt des Serums schützt vor dem Einwande, falls dieser bei der wiederholten Reinigung der Lösungen überhaupt in Betracht käme, dafs es sich um mechanische Verunreinigung des Euglobulins handeln könnte. Denn erfahrungsgemäfs weifs man, dafs die Fehlerquellen der Ausfällungsmethode bei der Antitoxindarstellung nicht so sehr in dem mechanischen Niederreifsen fremder Bestandteile als vielmehr darin bestehen, dafs vielfach bedeutende Antitoxinmengen der sonst ausreichenden Salzmenge beim Ausfällen entgehen, so dafs in der Regel bei der Konzentrierung des Heilkörpers mit bedeutenden Salzüberschüssen gearbeitet werden mufs. Andererseits beweist der Umstand, dafs das Pseudoglobulin hier vollständig unwirksam ist, während das Euglobulin nahezu den ganzen Antitoxingehalt enthält, dafs die Verteilung des Heilkörpers nicht eine durch äufserliche Momente bedingte ist. Da das Euglobulin aus salzhaltigen Lösungen durch Dialyse ausfällt, wie auch durch Kohlensäure und verdünnte Essigsäure zur Abscheidung gelangt, wenn auch in beiden Fällen unvollständig, so wird dennoch auf diese Weise ein grofser Teil des Ziegendiphtherieantitoxins im Gegensatze zum Pferdeantitoxin abgeschieden werden können. Auf diese Weise dürften wohl zum Teil die grofsen Verluste eine Erklärung finden, welche Wassermann wie auch Brieger und Cohn bei der Dialyse der nach Ehrlich mit Ammonsulfatfällung konzentrierten Molke zu beklagen hatten.

Das Ergebnis dieser über die Verteilung der im Pferde- und Ziegenserum angestellten Versuchsreihen führt zu dem überraschenden Schlusse, dafs in beiden Tiergattungen der Heilkörper durch ein und dasselbe Salz in verschiedener Weise ausgesalzen wird, indem er im Pferdeserum mit dem Pseudoglobulin, im Ziegenserum mit dem Euglobulin zusammen ausfällt*).

*) Es ist natürlich, dafs dieser Unterschied nur erkannt werden konnte mit Hilfe von Methoden, welche eine Differenzierung des bisher als einheitlich angesehenen Globulins erlaubten, während denjenigen Reagentien gegenüber, welche eine gemeinsame Fällung beider Körper bewirken, wie dem $MgSO_4$ oder verschiedenen Salzkombinationen mit diesem und anderen Salzen, ein solcher Unterschied nicht zu Tage trat. So mufste auch Brieger und Boer, welche mit Serumsorten verschiedener Tierspezies arbeiteten, der Einflufs entgehen, den die Herkunft des Serums auf die Isolierbarkeit der Immunkörper ausübt.

4. Versuche mit Tetanusantitoxin.

Dieselben Methoden, wie sie bei der Isolierung des Diphtherieantitoxins angeführt worden sind, fanden auch hier vielfach Anwendung. So machten Ehrlich und Brieger gerade bei der Isolierung des Tetanusantitoxins aus der Ziegenmilch zum erstenmal von ihrer Methode der fraktionierten Salzfällung Gebrauch, und Brieger und Cohn haben später am Ziegentetanusserum ihre mühevollen Reinigungsversuche durchgeführt. Tizzoni, der Hundeimmunserum benutzt hatte, fällte das wirksame Prinzip durch Sättigung mit schwefelsaurem Magnesium bei 30° aus. Endlich haben auch Brieger und Boer am Tetanusziegenserum sowie am Diphtherieantitoxin durch Kombination von Salzen, die an und für sich, selbst in der Wärme nicht einmal Spuren von Antitoxinen ausfällen, dieselben aus Blutserum wie auch aus der Milch vollständig quantitativ ausscheiden können. Diese Versuche, in denen Kochsalz in Verbindung mit Chlorkalium unter Umständen auch mit Jodkalium eine solche Wirkung entfalteten, verdienen deshalb besondere Aufmerksamkeit, weil sie beweisen, dafs durch den Vorgang der Immunisierung mit Toxinen die physikalischen Zustandsänderungen der Eiweifskörper kaum eine wesentliche Beeinflussung erfahren, und dafs die gleichen Gesetze, wie sie neuerdings Pauli[31]) für das native Eiereiweifs festgestellt hat, auch für die Eiweifskörper der antitoxischen Sera sich anwenden lassen.

Für die Darstellung des Tetanusantitoxins benutzte ich ein Pferdeserum, aus dem in der früher angegebenen Weise die beiden Globuline dargestellt worden waren. Insbesondere hier erwies es sich als notwendig, die beiden Globuline durch wiederholtes Lösen und Fällen (der Vorgang mufste häufig sechs- bis achtmal wiederholt werden) zu reinigen, um auch die letzten Spuren anhaftender Verunreinigungen, die bei der Prüfung der Wirksamkeit der beiden Präparate noch hervortreten, zu entfernen. Die zuletzt erhaltenen Produkte zeigten, dafs sich im Pferdeserum das Euglobulin von jeder Heilwirkung befreien, das Antitoxin bei Fällung mit Ammonsulfat entsprechend den Fällungsgrenzen des Pseudoglobulins nahezu vollständig gewinnen läfst. Die mit den reinen Substanzen erhaltenen Versuchsresultate mögen nachfolgend angeführt werden. Die Bestimmung des Antitoxinwertes geschah nach der Ehrlichschen Methode durch gleichzeitige Injektion der gemischten Toxin- und Antitoxindosis. Das Gewicht der verwendeten Mäuse schwankte zwischen 13 und 18 g.

Prüfung des Tetanustoxins.

0.001 ccm. 13. X. Injektion. 14. X. Kein Tetanus. 15. X. Kein Tetanus; Tier bleibt normal.

0.01 ccm. 13. X. Injektion. 14. X. Leichter Tetanus. 15. X. Starker Tetanus. 16. X. Allgemeiner Tetanus.

Prüfung des Ausgangsserums.

0.1 ccm Serum + 0,01 ccm Toxin. 15. X. Injektion. Bleibt normal.

0,01 ccm Serum + 0.01 ccm Toxin. 15. X. Injektion. Bleibt normal.

0,001 ccm Serum + 0,01 ccm Toxin. 15. X. Injektion. 16. X. Normal. 17. X. Tetanusverdächtig. 18. X. Leichter Tetanus. 19. X. Tetanus geht zurück.

0,001 ccm Serum + 0,01 ccm Toxin. 15. X. Injektion. 16. X. Normal. 18. X. Normal. 19. X. Leichter Tetanus. 20. X. Starker Tetanus.

Prüfung des Euglobulins.

0.1 ccm Euglobulin + 0,01 ccm Toxin. 15. X. Injektion. 16. X. Leichter Tetanus. 17. X. Starker lokaler Tetanus. 18. X. Allgemeiner Tetanus.

0.01 ccm Euglobulin + 0,01 ccm Toxin. 15. X. Injektion. 16. X. Starker lokaler Tetanus. 17. X. Allgemeiner Tetanus.

Prüfung des Pseudoglobulins.

0.1 ccm Pseudoglobulin + 0.01 ccm Toxin. 15. X. Injektion. 16. X. Normal: Tier bleibt normal.

0,01 ccm Pseudoglobulin + 0,01 ccm Toxin. 15. X. Injektion. 16. X. Normal. 17. X. Normal; Tier bleibt normal.

5. Versuche mit den bakteriolytischen Stoffen (Pfeiffer) aus Choleraimmunserum.

Über die Natur dieser interessanten Schutzstoffe im Blutserum choleraimmuner Ziegen hat bereits der Entdecker der Choleraantikörper R. Pfeiffer[33]) im Jahre 1896 gemeinschaftlich mit Proskauer[34]) Untersuchungen angestellt. Es gelang ihnen aber trotz vielseitiger Versuche nicht, die Frage zu entscheiden, welcher Gruppe von Körpern diese Immunstoffe angehören. Dagegen glaubten sie ihre Versuchsresultate, so besonders die Ergebnisse der Trennung durch Dialyse, Ausfällung mit Magnesiumsulfat und der Zerlegung durch Pepsin und Trypsin dahin deuten zu können, dafs die Substanzen, welche die Pfeiffersche Reaktion bewirken, nicht zur Gruppe der Globuline und Serumalbumine gehören. Die teilweise abweichenden Ergebnisse der nachstehend angeführten Versuche, die zunächst nicht über die Natur des wirk-

samen Körpers, sondern nur über sein Verhalten zu den Eiweifskörpern des Serums Aufschlufs geben sollten, erklären sich aus der Anwendung einer für den vorliegenden Zweck geeigneteren Trennungsmethode.

20 ccm eines frischen Choleraziegenserums wurden entsprechend den früher gefundenen Fällungsgrenzen mit dem halben Volumen einer gesättigten Ammonsulfatlösung vom spezifischen Gewichte 1,253 gefällt, der Niederschlag nach kurzem Absetzen filtriert und das Filtrat durch weiteren Salzzusatz auf halbe Sättigung gebracht; der hier ausgefallene Niederschlag wurde nach mehrstündigem Stehen aufs Filter gebracht und vom Serumalbumin getrennt. Der erste Niederschlag wurde nach sorgfältigem Abpressen zwischen Filtrierpapier noch ein zweites und ein drittes Mal gefällt und endlich wiederum in 20 ccm Wasser gelöst, während der zweite keiner weiteren Reinigung unterzogen wurde. Die stets den Niederschlägen anhaftenden geringen Salzmengen genügen, um eine glatte Lösung des Euglobulins in Wasser zu ermöglichen. Die Prüfung aller drei Lösungen — Fibrinoglobulin war nur sehr spärlich vorhanden und wurde gemeinsam mit dem Euglobulin ausgefällt — des Euglobulins, Pseudoglobulins und Albumins fand in der von Pfeiffer angegebenen Weise mit Bouillonaufschwemmungen 24stündiger Choleraagarkulturen statt, von denen $^1/_{100}$ Öse für ein Meerschweinchen von 300 g Gewicht sich als sicher letale Dosis erwies*). Es wurde demnach zu Beginn der Versuche als Prüfungsdosis $^1/_{20}$ Öse verwendet und später diese bei Abnahme der Virulenz auf $^1/_{10}$ Öse erhöht. Die Serumlösungen wurden ebenfalls mit Bouillon in gewünschter Weise verdünnt. Das Gewicht der Tiere schwankte zwischen 250 g und 300 g. Die Technik der Untersuchung folgte genau den Angaben Pfeiffers und war dieselbe, wie sie Pfeiffer und Proskauer anwandten.

Bestimmung des Titers der Choleraausgangslösung.

1) 13. IX. Serumverdünnung: 1 : 1600. Prüfungsdosis: $^1/_{10}$ Öse.

Exsudatentnahme nach		
7 Minuten:	Massenhaft lebhaft bewegliche Bakterien.	14. IX. Tier bleibt normal.
20 Minuten:	Reichlicher Körnchenzerfall neben zahlreichen zum Teil beweglichen Bakterien.	
40 Minuten:	Massenhaft Kügelchen und Granula, daneben spärliche, unbewegliche Bakterien.	
1 St. 7 Min.	Keine Bakterien sichtbar, massenhafte Kügelchen.	

*) Die Mitteilungen über die Virulenz der nach wiederholten Tierpassagen gewonnenen Cholerakultur verdanke ich ebenfalls Herrn Dr. Ernst Keller, der mir auch wiederholt in der freundschaftlichsten Weise bei den hier angeführten, zeitraubenden Tierversuchen behilflich war.

2) 13. IX. Serumverdünnung: 1 : 2000. Prüfungsdosis: $^1/_{10}$ Öse.

Exsudatentnahme nach		
10 Minuten:	Reichliche Bakterien neben vielen Kügelchen.	15. IX. Tier bleibt am Leben.
30 Minuten:	Reichliche Kügelchen, wenige sich bewegende Bakterien.	
45 Minuten:	Massenhaft Kügelchen, spärliche Bakterien, zum Teil beweglich.	
1 St. 12 Min.:	Nur Kügelchen, keine Bakterien sichtbar.	

3) 15. IX. Serumverdünnung: 1 : 2200. Prüfungsdosis: $^1/_{10}$ Öse.

Exsudatentnahme nach		
15 Minuten:	Massenhaft äufserst bewegliche Bakterien, spärliche Kügelchen.	16. IX. Tier bleibt am Leben.
25 Minuten:	Der gleiche Befund.	
45 Minuten:	Massenhaft durchs Gesichtsfeld schiefsende Bakterien, spärliche Kügelchen.	
1 Stunde:	Massenhafte Bakterien, die meisten unbeweglich, aber intakt. spärliche Kügelchen.	

4) 15. IX. Serumverdünnung: 1 : 2400. Prüfungsdosis: $^1/_{10}$ Öse.

Exsudatentnahme nach		
7 Minuten:	Massenhaft lebhaft bewegliche Bakterien, zum Teil unbeweglich.	16. IX. Tier krank, Diarrhöen.
19 Minuten:	Hier und da Kügelchen sichtbar, daneben reichlich intakte bewegliche Bakterien.	17. IX. Tier erholt sich, bleibt am Leben.
30 Minuten:	Massenhaft bewegliche Bakterien neben spärlichen Kügelchen.	
45 Minuten:	Der gleiche Befund.	
1 St. 15 Min.:	Massenhaft aufs lebhafteste bewegliche Bakterien. spärliche Körnchen.	

5) 13. IX. Kontrolltier ohne Serum: $^1/_{10}$ Öse.

Nach 5, 15, 30 und 45 Minuten: Überall reichliche bewegliche Bakterien in den Exsudatproben nachweisbar. 14. IX. morgens †.

Auf Grund dieser Versuche konnte der Lösungswert unseres Serums als zwischen einer 2200fachen und 2400fachen Verdünnung gelegen angenommen werden.

Bestimmung des Titers der Euglobulinlösung.

6) Serumverdünnung: 1 : 400. Prüfungsdosis: $^1/_{20}$ Öse.

Exsudatentnahme nach		
5 Minuten:	Zahlreiche bewegliche Vibrionen, keine Körnchen sichtbar.	28. VIII. Tier bleibt am Leben.
15 Minuten:	Vereinzelte bewegliche Vibrionen, massenhaft Kügelchen.	
27 Minuten:	Keine Bakterien mehr sichtbar.	

7) Serumverdünnung: 1 : 600. Prüfungsdosis: $^1/_{20}$ Öse.

Exsudatentnahme nach

18 Minuten:	Bewegliche Vibrionen.	28. VIII. Tier bleibt am Leben.
30 Minuten:	Hier und da unbewegliche Vibrionen sichtbar, massenhaft Körnchen oder Kügelchen.	

8) Serumverdünnung: 1 : 800. Prüfungsdosis: $^1/_{20}$ Öse.

Exsudatentnahme nach

5 Minuten:	Massenhaft bewegliche Bakterien, keine Granula.	30. VIII. Tier bleibt am Leben.
15 Minuten:	Zahlreiche lebhaft bewegliche Bakterien, hier und da Degenerationsformen und Kügelchen.	
30 Minuten:	Vereinzelte intakte Bakterien, massenhaft Kügelchen und Zerfallsformen.	
45 Minuten:	Massenhaft Kügelchen, vereinzelte unbewegliche Bakterien.	

9) Serumverdünnung: 1 : 1200. Prüfungsdosis: $^1/_{20}$ Öse.

Exsudatentnahme nach

8 Minuten:	Zahlreiche isolirte, sich bewegende Bakterien, daneben aber auch Kügelchen.	30. VIII. Tier bleibt am Leben.
20 Minuten:	Spärliche Bakterien, zahlreiche Kügelchen und Granula.	
42 Minuten:	Keine Vibrionen sichtbar, nur massenhafte Kügelchen.	

10) 29. VIII. Serumverdünnung: 1 : 1600. Prüfungsdosis: $^1/_{20}$ Öse.

Exsudatentnahme nach

8 Minuten:	Zahlreiche isolierte Bakterien.	30. VIII. Tier bleibt am Leben.
17 Minuten:	Reichliche Bakterien neben vielen Kügelchen und Körnchenformen.	
33 Minuten:	Keine Vibrionen sichtbar, dagegen massenhaft Kügelchen und Körnchen.	
52 Minuten:	Massenhafte Kügelchen, am Rande des Tropfens unbewegliche intakte Vibrionen.	

11) 30. VIII. Serumverdünnung: 1 : 2000. Prüfungsdosis: $^1/_{20}$ Öse.

Exsudatentnahme nach

12 Minuten:	Zahlreiche isolierte bewegliche Bakterien.	31. VIII. Morgens †.
24 Minuten:	Zahlreiche Bakterien zum grofsen Teil unbeweglich, daneben reichlich Kügelchen und in Zerfall begriffene Vibrionen.	
42 Minuten:	Der gleiche Befund, jedoch zahlreiche isolierte und veränderte Bakterien.	
55 Minuten:	Zahlreiche bewegliche und unbewegliche Bakterien neben Kügelchen.	
1 St. 10 Min.:	Massenhafte lebhaft bewegliche Bakterien, daneben Kügelchen.	

Bestimmung des Titers der Pseudoglobulinlösung.

12) 31. VIII. Serumverdünnung: 1 : 100. Prüfungsdosis: $^1/_{20}$ Öse.

Exsudatentnahme nach		
5 Minuten:	Reichliche bewegliche Bakterien, keine Kügelchen.	1. IX. Tier bleibt am Leben.
19 Minuten:	Bewegliche Bakterien, spärlicher als vorher, daneben reichliche Kügelchen.	
35 Minuten:	Sehr spärliche Bakterien, massenhaft Kügelchen und Körnchen.	
57 Minuten:	Keine Bakterien sichtbar, sehr zahlreiche Kügelchen.	

13) 31. VIII. Serumverdünnung: 1 : 200. Prüfungsdosis: $^1/_{20}$ Öse.

Exsudatentnahme nach		
5 Minuten:	Zahlreiche lebhaft bewegliche Bakterien.	1. IX. Tier bleibt am Leben.
10 Minuten:	Reichliche isolierte, lebhaft bewegliche Bakterien, daneben zahlreiche Kügelchen.	
26 Minuten:	Reichliche sich bewegende und unbewegliche, isolierte Bakterien, zahlreiche Kügelchen.	
41 Minuten:	Der gleiche Befund wie vorher.	
58 Minuten:	Neben vielen Kügelchen überall reichlich im Gesichtsfelde verteilte intakte, bewegliche und unbewegliche Vibrionen.	
1 St. 16 Min.:	Reichliche lebhaft bewegliche Bakterien, daneben zahlreiche Kügelchen.	

14) 30. VIII. Serumverdünnung: 1 : 400. Prüfungsdosis: $^1/_{20}$ Öse.

Exsudatentnahme nach		
4 Minuten:	Massenhafte isolierte, lebhaft bewegliche und unbewegliche Bakterien, keine Körnchen und Kügelchen.	31. VIII. †.
17 Minuten:	Zahlreiche zum Teil in Zerfall begriffene Bakterien neben vielen intakten beweglichen. Kügelchenbildung sichtbar.	
32 Minuten:	Zahlreiche lebhaft bewegliche Bakterien, daneben reichlich Kügelchen.	
50 Minuten:	Der gleiche Befund.	
1 St. 16 Min.:	Massenhaft lebhaft bewegliche Bakterien, daneben auch Granula und Kügelchen.	

Bestimmung des Titers der Albuminfraktion.

15) 31. VIII. Serumverdünnung: 1:50. Prüfungsdosis: $^1/_{20}$ Öse.

Exsudatentnahme nach		
6 Minuten:	Zahlreiche Körnchen.	1. IX. Tier am Morgen †.
17 Minuten:	Massenhaft Kügelchen u. Körnchen.	
54 Minuten:	Spärliche, meist unbewegliche Bakterien, massenhafte Kügelchen und Körnchen.	

16) 28. VIII. Serumverdünnung: 1:200. Prüfungsdosis: $^1/_{20}$ Öse.

Exsudatentnahme nach		
5 Minuten:	Massenhaft bewegliche, isolierte Bakterien.	20. VIII. Tier †.
15 Minuten:	Der gleiche Befund.	
30 Minuten:	Isolierte, aufs lebhafteste bewegliche, zahlreiche Bakterien, hier und da Körnchen.	
1 Stunde:	Der gleiche Befund.	
1 St. 15 Min.:	Massenhaft bewegliche, isolierte Vibrionen.	

17) 28. VIII. Kontrolltier ohne Serum. Prüfungsdosis: $^1/_{20}$ Öse.

Die nach 5, 15 und 30 Minuten entnommenen Exsudatproben zeigen massenhaft bewegliche Bakterien ohne Zerfall. Tier wird am nächsten Morgen tot aufgefunden.

Die Durchsicht der angeführten Versuche läfst sehr deutlich erkennen, dafs es mit Hilfe der angewandten Methode leicht gelingt, eine nahezu vollständige Ausfällung der Antikörper in der ersten Fraktion entsprechend der Euglobulinfällung zu erhalten. Im Gegensatze zur Magnesiasulfatfällung ist es hier schon bei einer sehr geringen Salzkonzentration möglich, die Antikörper des Serums gut zu isolieren. Die geringen Mengen wirksamer Substanz, welche der ersten Fällung entgehen, lassen sich aus dem Pseudoglobulin, dessen weitere Reinigung hier unterlassen wurde, wohl leicht entfernen. Endlich zeigt es sich, dafs dem Albumin keinerlei bakteriolytische Wirkung anhaftet.

Die Resultate von Pfeiffer und Proskauer sind vermutlich durch die häufig unzuverlässige Fällung bei Sättigung von Lösungen mit festem Magnesiasulfat bedingt, andererseits sind sie beeinflufst durch die damals allgemein geteilte Ansicht, dafs das gesamte Globulin durch Dialyse auszufällen sei, eine Annahme, die sich neuerdings als irrtümlich erwies. Es ist daher auch klar, dafs unsere Befunde bezüglich der chemischen Natur der Antikörper

wohl andere Deutungen zulassen als die von Pfeiffer und Proskauer angeführten, etwa solche, wie sie sich in den nachfolgenden Untersuchungen für die Bakterienkoaguline und Agglutinine ergeben.

6. Versuche mit Typhusagglutininen.

Trotz der allseitigen Ausdehnung und Vertiefung des Studiums des Gruberschen[35]) Phänomens wurde die Frage über die chemische Natur der bei demselben in Frage kommenden Substanzen von verhältnismäfsig wenig Autoren in Angriff genommen. Über die hier in Betracht kommenden Körper des Typhusimmunserums haben zunächst Widal und Sicard[86]) Angaben gemacht. Sie fanden, dafs durch Sättigung von Serum oder Plasma mit Magnesiumsulfat bei Zimmertemperatur mit dem Globulin zugleich das Agglutinin mehr oder minder vollständig ausgefällt werden könne. Ähnlich verhielt sich auch das Agglutinin in der Milch; ebenso konnten durch Kochsalz aus Oxalatplasma und durch Versetzen von Milch mit Essigsäure Niederschläge erhalten werden, welche wirksame Substanz enthielten. In neuester Zeit konnte Winterberg[15]) in seinen ausführlichen Untersuchungen desselben Körpers weitere wertvolle Beiträge zu dessen näherer Charakterisierung beibringen; auch er fand, dafs das Typhusserumagglutinin „aus seinen Lösungen mehr oder minder vollständig ausgesalzen werden könne, wobei im allgemeinen ein den Globulinen ähnliches Verhalten zu konstatieren ist. Doch bestehen hinreichende Unterschiede, welche gegenüber der Gesamtheit der als Globuline bezeichneten Körper eine Differenzierung gestatten". Die hier zunächst zu behandelnde Frage über das Verhalten der die Bakterien agglutinierenden Substanz zu den beiden Globulinen des Serums wurde in derselben Weise in Angriff genommen wie in den früheren Abschnitten. Da die Ausführung der Reaktion ohne Benutzung irgendwelchen Tiermaterials in bequemer Weise möglich ist, so konnte hier noch viel bequemer als bei dem Studium der Antitoxine und Bakteriolysine die Verteilung der wirksamen Substanzen im Serum verfolgt werden.

Die Versuchsanordnung war ähnlich derjenigen, wie sie gelegentlich der Bestimmung der Fällungsgrenzen im Serum diphtherieimmuner Pferde angeführt worden ist.

Die bei der schrittweise erfolgten Eiweifsausfällung durch Ammonsulfatlösung aus je 2 ccm des fünffach verdünnten Serums erhaltenen Nieder-

a) Pferdeserum.

Nummer	Immunserum	H_2O	Gesättigte Ammonsulfatlösung	Fällung	Agglutinationsgehalt der Lösung		Bemerkungen
					des Niederschlags	des Filtrats	
1	2	5,6	2,4	Opaleszenz	—	—	
2	2	5,4	2,6	„	Der Agglutinationswert betr. 1 : 300		
3	2	5,2	2,8	Opal., bei längerem Stehen Niederschl.	1 : 20	1 : 300	Beginn der Fällungsgrenze des Euglobulins.
4	2	5,0	3,0	Niederschlag	1 : 20	1 : 300	
5	2	4,8	3,2	„	1 : 20 pos. 1 : 50 neg.	1 : 300 unvollst. 1 : 200 pos.	
6	2	4,6	3,4	Flockiger Niederschl.	1 : 100 neg. 1 : 50 pos.	1 : 200 pos. 1 : 300 unvollst.	Oberes Ende d. Fällungsgrenze des Euglobulins u. Beginn der Pseudoglobulinfällung.
7	2	4,4	3,6	„ „	1 : 100 pos. 1 : 200 neg.	1 : 200 pos. 1 : 300 neg.	
8	2	4,2	3,8	„ „	1 : 100 pos. 1 : 200 neg.	1 : 200 pos. 1 : 300 neg.	
9	2	4,0	4,0	„ „	1 : 200 pos. 1 : 300 neg.	1 : 100 pos. 1 : 150 unvollst.	
10	2	3,8	4,2	„ „	1 : 200 pos. 1 : 300 unvollst.	1 : 100 pos. 1 : 150 neg.	Ende der Pseudoglobulinfällung.
11	2	3,6	4,4	„ „	1 : 300 pos.	1 : 50 unvollst. 1 : 100 neg.	

schläge wurden, sorgfältig abgepreſst, in 10 ccm Wasser gelöst. Sowohl in dieser Lösung als auch in dem salzhaltigen Filtrat des Niederschlages wurde der Gehalt an agglutinierender Substanz bestimmt. Dabei wurden die Verdünnungen eines jeden Filtrats und Niederschlages in möglichst nahen Intervallen vorgenommen. In den Tabellen wurden der Übersicht wegen nur die gefundenen Grenzwerte verzeichnet, deren Summe im Filtrate und im Niederschlage stets dem Gesamtwerte der, auf das Fünffache verdünnten Ausgangslösung entspricht. Die sich stellenweise ergebenden Abweichungen von der Gesamtsumme der Agglutinineinheiten der Ausgangslösungen sind einmal darauf zurückzuführen, daſs nicht überall durch die vorgenommene Verdünnung der Grenzwert eben erreicht wurde, sondern zwischen zwei in einem weiteren Zwischenraume gelegenen Verdünnungen liegt, anderseits dürften sie sich aus geringen Verlusten erklären, die sich beim Sammeln des Niederschlages auf den Filtern und bei der Filtration ergaben.

Die Beobachtungen wurden durchaus im Reagenzglase makroskopisch angestellt und nötigenfalls durch Versuche im hängenden Tropfen mikroskopisch kontrolliert. Zu den Versuchen wurden Aufschwemmungen von 12- bis 16stündigen Agarkulturen eines und desselben Stammes benutzt, die mit 0,6 prozentiger Kochsalzlösung hergestellt worden waren. Ebenso wurden die bei der Bestimmung der Wertigkeit einzelner Lösungen notwendigen Verdünnungen mit physiologischer Kochsalzlösung ausgeführt. Die mit Typhuskulturen beschickten Proben wurden 6 bis 10 Stunden im Brutschranke gehalten und der nach dieser Zeit sich ergebende Befund verzeichnet. Bei mikroskopischer Beobachtung wurde eine zweistündige Bruttemperatur eingehalten. Das hier verwendete Serum gab bei einer Verdünnung von 1 : 1500, die als Grenzwert angenommen wurde, deutliche Agglutination.

(Tabelle siehe vorige Seite.)

Diese Versuchsreihe läſst unschwer erkennen, daſs der Beginn der Ausfällung des Serumagglutinins, wofern von dem geringen Agglutinationsgehalte der Niederschläge der Proben 3, 4 und 5 abgesehen wird, der gelegentlich anderweitiger Versuche seine Erklärung findet, sich scharf an das Ende der oberen Fällungsgrenze des Euglobulins oder die untere sich anschlieſsende des Pseudoglobulins hält. Der gleiche Versuch wurde mit demselben Ergebnis an einem Serum angestellt, dessen Grenzwert bei einer Verdünnung von 1 : 20000 lag; auch hier lieſs sich die scharfe Übereinstimmung der Fällungsgrenzen des Pseudoglobulins mit denen der bakterienagglutinierenden Substanz feststellen.

Entsprechend diesen Befunden wurden aus 30 ccm eines Typhusimmunserums, dessen Titer 1 : 20000 betrug, die beiden Globuline durch einmalige Fällung dargestellt, die Niederschläge mit der entsprechend verdünnten Salzlösung sorgfältig gewaschen, gut abgepreſst und in einer dem Ausgangsvolumen von 30 ccm entsprechenden Menge Wassers gelöst. Die Bestimmung des Agglutinationsgehaltes ergab:

Verdünnung	1 : 20	1 : 200	1 : 2000	1 : 10000	1 : 20000
Lösung des Euglobulins .	Aggl.	Aggl.	unvollst. Aggl.	negat.	negat.
Lösung d. Pseudoglobulins	„	„	Aggl.	Aggl.	Aggl.

Während die Lösung des Pseudoglobulins den vollen Agglutiningehalt besafs, waren in der Euglobulinlösung nur geringe Mengen des Agglutinins nachweisbar, welche wohl zum gröfsten Teil auf Verunreinigungen zu beziehen sind, die durch wiederholtes Lösen und Fällen derselben nahezu vollständig entzogen werden können. Hier erfolgte deshalb keine weitere Reinigung, um die mit dieser stets verbundenen Verluste zu vermeiden und um einen möglichst guten quantitativen Vergleich mit den analogen Versuchen, welche andere Blutarten betrafen, zu besitzen.

b) Ziegenserum.

Das hier verarbeitete Serum war eben noch im stande, bei einer Verdünnung von 1 : 2600 Typhusbakterien zu agglutinieren. Die Bestimmung der Fällungsgrenzen lieferte nachfolgende Verhältnisse. Die Reaktion des Serums war nativ alkalisch.

Nummer	Serum	H_2O	Ammonsulfat	Fällung	Agglutinationsgehalt d. Niederschl.	Agglutinationsgehalt des Filtrats	Bemerkungen
1	2	5,6	2,4	Klar	Die Lösungen agglutinieren in einer Verdünnung von 1 : 500.		
2	2	5,4	2,6	Opal.			
3	2	5,2	2,8	Trübung, nach mehrstündigem Stehen Niederschlag.	1 : 80 + 1 : 100 neg.	1 : 500 Unvollst. Aggl.	Beginn der Euglobulinfällung.
4	2	5,0	3,0	Flock. Niederschl.	1 : 80 + 1 : 100 neg.	1 : 400 +	
5	2	4,8	3,2	„ „	1 : 150 + 1 : 200 neg.	1 : 200 + 1 : 300 Unvollst. Aggl.	
6	2	4,6	3,4	„ „	1 : 250 + 1 : 300 neg.	1 : 200 +	
7	2	4,4	3,6	„ „	1 : 500 +	1 : 80 + 1 : 100 Unvollst. Aggl.	Obere Fällungsgrenze des Euglobulins.
8	2	4,2	3,8	„ „	1 : 500 +	1 : 60 + 1 : 80 neg.	

20 ccm desselben Serums werden mit 10 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt und das Filtrat durch weiteren Salzzusatz auf Halbsättigung gebracht. Beide Niederschläge werden in gleicher Weise wie früher weiter behandelt. Die beiden endlich erhaltenen wässerigen Lösungen lieferten nachstehende Agglutinationszahlen:

Euglobulinlösung:

Verdünnung	1:20	1:200	1:400	1:800	1:1200	1:1600	1:2000	1:2400	1:2600
Durch einmalige Fällung erhalten . .	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	neg.
Durch dreimal. Fällung erhalten . .	„	„	„	„	„	„	„	„	„

Pseudoglobulinlösung:

Nach einmal. Fällung	Aggl.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Aus beiden Versuchsreihen ergiebt sich übereinstimmend die Thatsache, dafs die „Typhusbakterien agglutinierende Substanz" beinahe ausschliefslich mit der Ausfällung des Euglobulins aus dem Serum zu entfernen ist und so ein vollständig anderes Verhalten zeigt als das im Pferdeimmunserum vorhandene Agglutinin.

Es galt hier zunächst nach Möglichkeit jene Momente auszuschliefsen, welche nichts mit der physiologischen Wirksamkeit des Serums gemein hatten und trotzdem die Fällungsgrenzen des Serums bedeutend beeinflussen konnten. Wissen wir ja doch, dafs insbesondere Konzentration und Säure- oder Alkaleszenzgehalt der Flüssigkeit die Fällungsgrenzen verschieben können. Freilich kommen dabei stets viel gröfsere Differenzen in Betracht, als hier die Veränderungen der beiden Sera jemals betragen könnten. Ausgedehnte Untersuchungen über den Salzgehalt und die Alkaleszenz des Blutes und der Sera verschiedener Säugetiere, die Gürber[37]) ausgeführt hat, lehren, dafs sich in dieser Beziehung zwischen den einzelnen Tierarten nur geringe Unterschiede ergeben, die kaum im stande wären, die hier und schon früher gefundenen Differenzen aufzuklären. In der That konnte man sich durch Vermischung des oben benutzten Typhusimmunserums mit der gleichen Menge eines normalen Ziegenserums leicht überzeugen, dafs die Fällungsverhältnisse des Typhusagglutinins durch die Anwesenheit des Ziegenserums keinerlei Veränderung erfahren.

Nichtsdestoweniger konnten Bedenken erhoben werden, ob nicht etwa andere uns bisher nicht geläufige physikalische oder

chemische Zustandsänderungen der beiden Immunsera das auffallende Resultat bedingen. Solchen wie auch den oben angedeuteten Einwänden konnte leicht begegnet werden, wenn aus einer Mischung der beiden Immunsera die beiden Körper wieder getrennt werden konnten. Es ist klar, dafs dieser Nachweis in dem gegebenen Falle, wo beide Körper — das Ziegeneuglobulin und das Pferdepseudoglobulin — die gleichen physiologischen Wirkungen — Agglutination der Typhusbakterien — entfalteten, selbst in dem Falle, dafs beide Körper nach Mischung ihrer Lösungen mit ihren physiologischen Eigenschaften wieder getrennt erhalten worden wären, viel an seiner Prägnanz verloren hätte, da ja stets der Agglutiningehalt des einen oder anderen Körpers nur als eben nicht ausgefällter oder mechanisch mit in den Niederschlag gelangter Rest der sonst einheitlichen Substanz angesehen werden könnte. Die Bedingungen für diesen Nachweis konnten aber ungleich günstiger gestaltet werden bei Benutzung eines andersartigen Immunserums, das infolge der verschiedenen physiologischen Wirkung bei sonst identischen Verhältnissen die Ausführung eines einwandsfreien Versuches erlaubte. Ein solches Material stand uns im Choleraimmunziegenserum und andererseits im Choleraimmunpferdeserum zur Verfügung, deren Fällungsverhältnisse in den folgenden Versuchsreihen angeführt sind.

Zunächst aber mögen hier noch zwei Versuchsreihen Platz finden, die über die analogen Verhältnisse bei dem Kaninchen- und Meerschweinchenserum Aufschlufs geben.

c) Kaninchenserum.

Ein 3 kg schweres Kaninchen wurde mittels intraperitonaler, durch etwa drei Wochen in fünftägigen Pausen fortgesetzter Injektionen anfangs abgetöteter, später virulenter Aufschwemmungen von Typhusagarkulturen immunisiert. Das Serum des Tieres gewann nach dieser Zeit ein Agglutinationsvermögen, das erst bei einer Verdünnung von 1 : 20000 seinen Grenzwert fand. Das Serum dieses Tieres (2000) wurde zur Darstellung der beiden Globuline verarbeitet. Es ergab sich nach je einmaliger und mehrmaliger Fällung der beiden Globuline folgender Agglutinationswert der Lösungen:

Lösung des Euglobulins:

Verdünnung	1:20	1:200	1:400	1:600	1:1000	1:2000	1:3000	1:4000	1:8000	1:10000	1:20000
Nach einmal. Fällung . .	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.
Nach viermal. Fällung . .	„	„	„	„	„	„	„	„	„	schwache Aggl.	neg.

Lösung des Pseudoglobulins:

Nach einmal. Fällung . .	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	neg.	neg.	neg.	neg.
Nach dreimal. Fällung . .	„	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	„	„	„	„

Albuminfraktion: durchaus unwirksam.

d) Meerschweinchenserum.

In derselben Weise wie beim Kaninchen fand auch hier die Immunisierung mit Typhuskulturen statt. Das Serum des Tieres war noch im stande, bei einer Verdünnung von 1:6000 eine vollständige Agglutination herbeizuführen, während eine höhere Verdünnung, 1:8000 und 1:10 000, nur unvollständig Typhusbakterien agglutinierte. Die aus diesem Serum dargestellten Globuline zeigten:

Lösung des Euglobulins:

Verdünnung	1:20	1:200	1:2000	1:4000	1:6000	1:8000	1:10 000
Nach einmaliger Fällung	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	unvollständige Aggl.	
Nach viermaliger Fällung	„	„	„	„	neg.	neg.	neg.

Filtrat des Euglobulins (enthaltend Pseudoglobulin und Albumin):

Aggl.	unvollst. Aggl.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

Es erübrigt kaum, diesen beiden Versuchsreihen etwas hinzuzufügen. Sowohl Meerschweinchen- wie Kaninchenimmunserum zeigen eine völlige Übereinstimmung mit den bei dem Typhusimmunziegenserum vorgefundenen Verhältnissen, indem ausschliefslich das Euglobulin der Träger der physiologisch wirksamen Substanz ist.

7. Versuche mit Choleraagglutininen.

Die hier angeführten Versuche wurden gleichzeitig und in genauer Übereinstimmung mit denen des Typhusimmunserums ausgeführt; auch die Versuchstechnik war die gleiche geblieben. Als Bakterienkulturen wurden wiederum 12- bis 18stündige Choleraagarkulturen verwendet.

a) Pferdeserum.

Die volle Wirksamkeit des Serums reichte bis zu einer Verdünnung von 1:10 000, zeitweilig konnte noch bei einer etwas höheren Verdünnung Agglutination, wenn auch unvollständig, erzielt werden.

Nr.	Serum ccm	H_2O ccm	Ammonsulfat ccm	Fällung	Agglutiningehalt der Lösung des Niederschlages	Agglutiningehalt des Filtrats	Bemerkungen
1	2	5,2	2,8	Leichte Trübung	1:200 neg.	1:2000 pos.	Untere Grenze der Euglobulinfällung.
2	2	5,0	3,0	Feiner, flockiger Niederschlag	1:400 pos. 1:700 neg.	1:1000 pos. 1:2000 neg.	
3	2	4,8	3,2	Flockiger Niederschlag	1:1000 pos. 1:2000 neg.	1:400 unvollst. Aggl.	
4	2	4,6	3,4	Desgl.	1:2000 pos.	1:200 unvollst. Aggl.	Obere Fällungsgrenze des Euglobulins, Beginn der Pseudoglobulinfällung.
5	2	4,4	3,6	Desgl.	1:2000 pos.	1:200 neg.	
6	2	4,2	3,8	Desgl.	1:2000 pos.	1:200 neg.	
7	2	4,0	4,0	Desgl.	1:2000 pos.	1:200 neg.	

30 ccm desselben Cholerapferdeserums wurden in analoger Weise wie bei bei dem Typhuspferdeimmunserum verarbeitet und die Lösungen der beiden Globuline auf ihr Agglutinationsvermögen geprüft:

Verdünnung	1:20	1:200	1:2000	1:4000	1:6000	1:10 000
Lösung des Euglobulins nach einmaliger Fällung . . .	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.
Lösung des Pseudoglobulins nach einmaliger Fällung .	„	„	neg.	neg.	neg.	neg.

Die beiden Reihen ergaben, dafs die Verteilung der Choleraagglutinine im Pferdeserum derart sich gestaltet, dafs der gesamte oder nahezu der volle Agglutiningehalt dem Euglobulin angehört, während das Pseudoglobulin entweder nur der Ausfällung entgangene Reste oder kein Choleraagglutinin enthält. Schon der Umstand, dafs in dem Serum derselben Tierart unter den gleichen Versuchsbedingungen, wie sie beim Typhus- und dem Choleraimmunpferdeserum eingehalten worden waren, die Cholera- und Typhusagglutinine eine verschiedene Verteilung erfahren, zeigt, dafs dieselbe von den physikalischen Verschiedenheiten der Sera, wie sie etwa bei zwei Tierspezies in Betracht kämen, unabhängig ist.

b) Ziegenserum.

Das hier benutzte Serum hatte seinen Grenzwert bei einer Verdünnung von 1:1000; die Bestimmung der Fällungsgrenzen ergab Folgendes:

Nr.	Serum ccm	H_2O ccm	Ammonsulfat ccm	Fällung	Agglutiningehalt der Lösung des Niederschlages	Agglutiningehalt des Filtrats	Bemerkungen
1	2	5,6	2,4	Opaleszenz	Agglutiningehalt der Lösung 1:200 +		Beginn der Fibrinoglobulinfällung.
2	2	5,4	2,6	Opal., bei längerem Stehen Niederschlag	1:20 unvollst. Aggl.	—	
3	2	5,2	2,8	Desgl.	1:20 unvollst. Aggl.	1:200 +	Ende der Fibrinoglobulinfällung.
4	2	5,0	3,0	Trüb; Niederschlagsbildung	1:50 unvollst. Aggl. 1:100 neg.	1:150 +	Beginn der Euglobulinfällung.
5	2	4,8	3,2	Niederschlag	1:50 + 1:100 neg.	1:50 + 1:100 neg.	
6	2	4,6	3,4	„	1:100 + 150 unvollst. 1:200 neg.	1:20 + 1:50 unvollständig	
7	2	4,4	3,6	„	1:150 + 1:200 neg.	1:20 +	Ende der Euglobulinfällung u. Beginn der Pseudoglobulinfällung.
8	2	4,2	3,8	„	1:150 + 1:200 neg.	1:20 unvollst. Aggl.	

Es ergiebt sich aus diesen Versuchen zunächst, dafs Fibrinoglobulin, welches in diesem Serum reichlicher vorhanden war als in den früher benutzten, keinen Agglutiningehalt besitzt, wie der geringe oder fehlende Agglutinationsgehalt der entsprechend den Fällungsgrenzen von 2,4 ccm Salz zu 7,6 ccm Lösung bis 2,8 ccm Salz zu 7,2 ccm Lösung ausgefallenen Niederschläge beweist. Die Ausfällung des Agglutinins beginnt hier erst mit dem Beginne der eigentlichen Euglobulinfällung und erreicht auch ihr Ende, wenn diese ihre obere Grenze gefunden hat; allerdings zeigt sich auch hier, dafs geringe Reste des Agglutinins der Fällung entgehen können, eine Fehlerquelle, die bei der Auffindung der oberen Sättigungsgrenze zu Irrtümern leicht führen könnte. Indes kann die Richtigkeit derselben bequem im nachfolgenden Versuche kontrolliert werden.

Die aus 20 ccm eines Immunserums, das in einer Verdünnung von 1:2000 noch Cholerabakterien agglutinierte, durch Drittel-Salzsättigung und aus dem Filtrate dieser Fällung durch halbe Sättigung erhaltenen Körper werden nach üblicher Behandlung in wässerige Lösungen zu je 20 ccm gebracht:

Verdünnung	1:20	1:200	1:500	1:1000	1:1200	1:1400	1:1600	1:1800	1:2000
Lösung des Euglobulins	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	neg.

Verdünnung	1:20	1:40	1:80	1:100	1:200	1:400
Lösung des Pseudoglobulins	Aggl.	Aggl.	Aggl.	neg.	neg.	neg.

8. Verteilung der Typhus- und Choleraagglutinine in einem Gemenge von Typhus- und Choleraimmunserum.

a) Mischung des Typhus- und Choleraimmunpferdeserums.

25 ccm eines Typhusimmunserums von dem noch wirksamen Verdünnungswert 1:20 000 werden mit der gleichen Menge eines Choleraserums von dem Titer 1:10 000 gemischt, 48 Stunden bei Bruttemperatur stehen gelassen und in der Mischung hierauf der Agglutinationswert für Typhus- und Cholerabakterien in nachfolgender Weise bestimmt:

Nr.	Mischung ccm	H_2O ccm	Ammonsulfat ccm	Fällung	Agglutinationswert der Niederschläge		Agglutinationswert der Filtrate		Bemerkungen
					gegen Typhusbakter.	gegen Cholerabakter.	gegen Typhusbakter.	gegen Cholerabakter.	
1	2	5,2	2,8	Opaleszenz; bei längerem Stehen Niederschlag	1:200 unvollst. Aggl. 1:400 neg.	1:200 pos. 1:400 neg.	1:4000 pos.	1:2000 pos.	Beginn der Euglobulinfällung.
2	2	5,0	3,0	Trübung und Niederschlag	1:400 unvollst. Aggl.	1:400 pos. 1:700 neg.	1:4000 pos.	1:1000 unvollst. Aggl. 1:2000 neg.	
3	2	4,8	3,2	Niederschlag	1:400 unvollst. Aggl.	1:1000 unvollst. 1:2000 neg.	1:4000 unvollst. Aggl.	1:700 neg. 1:400 pos.	
4	2	4,6	3,4	„	1:700 pos. 1:1000 neg.	1:1000 pos. 1:2000 neg.	1:2000 pos. 1:4000 neg.	1:200 neg.	Ende der Euglobulinfällung, Beginn der Pseudoglobulinfällung.
5	2	4,4	3,6	„	1:1000 pos. 1:2000 neg.	1:2000 pos.	1:1000 pos. 1:2000 neg.	1:200 neg.	
6	2	4,2	3,8	„	1:2000 pos. 1:4000 neg.	1:2000 pos.	1:1000 unvollst. Aggl. 1:2000 neg.	1:200 neg.	
7	2	4,0	4,0	„	1:4000 unvollst. Aggl.	1:2000 pos.	1:400 unvollst. Aggl. 1:700 neg.	1:200 neg.	
8	2	3,8	4,2	„	1:4000 pos.	1:2000 pos.	1:200 pos. 1:400 unvollst.	1:200 neg.	Ende der Pseudoglobulinfällung.

Überblickt man die vorliegende Tabelle, so ersieht man aus dem Vergleiche der Agglutinationswerte der Niederschläge und Filtrate gegenüber den Typhusbakterien, dafs dieselben in den Niederschlägen entsprechend deren zunehmender Mächtigkeit nur langsam ansteigen, bei der oberen Fällungsgrenze des Euglobulins (zwischen 3,4 bis 3,6 ccm Ammonsulfatzusatz) etwa den vierten Teil des Gesamtgehaltes erreichen, von dem der gröfste Teil wohl auf Kosten einer mechanischen Fällung zu setzen ist, um erst bei einem Salzzusatz von 4,2 ccm auf 6,8 ccm der Gesamtlösung ungefähr den Höhepunkt der ausfällbaren Werte im Niederschlage zu vereinigen. Es liegt daher hier erst die obere Fällungsgrenze des Typhusserumagglutinins, während die untere, nach dem Verhalten des Agglutiningehaltes der Filtrate zu beurteilende, bei einem Gehalte von 3,4 ccm Salz zu 6,6 ccm der Lösung beginnt. Sollte sich in der Mischung das Choleraagglutinin nur durch seine spezifische Eigenschaft, die Cholerabakterien zu agglutinieren, von denen des Typhusagglutinins bei sonst chemisch und physikalisch gleichbleibenden Eigenschaften unterscheiden, so wäre zu erwarten, dafs dessen Agglutinationswerte, und zwar ohne Rücksicht auf den absoluten Gehalt an Agglutinin der Ausgangslösung, in denselben Verhältnissen bei Zunahme der Niederschläge wachsen und in den zugehörigen Filtraten abnehmen wie das Typhusserumagglutinin. Bei der Verfolgung jedoch der Choleraagglutinationswerte ergiebt sich, dafs durchaus nicht ihr Maximum in den Niederschlägen oder ihr Minimum in den Filtraten gemeinsam mit dem Typhusagglutinin zu finden ist. Die Choleraagglutinine erreichen rasch nach dem Beginn der Niederschlagsbildung einen ansehnlichen Wert und sind bei der oberen Fällungsgrenze des Euglobulins völlig ausgefällt. So ersieht man denn aus dieser Versuchsreihe, dafs beide Agglutinine in der Mischung ihre selbständigen Fällungsgrenzen wahren.

b) Mischung von Typhusimmunpferdeserum mit Choleraimmunziegenserum.

10 ccm des schon früher benutzten Choleraziegenserums wurden mit der gleichen Menge des ebenfalls vorher angewandten Typhuspferdeserums versetzt und die Flüssigkeit zwei Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach dieser Zeit wurde die Lösung mit dem halben Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, der massige Niederschlag über Nacht stehen gelassen, am nächsten Morgen filtriert, gewaschen und in 20 ccm H_2O gelöst. Sowohl in dieser Lösung als auch in dem 20 ccm messenden Filtrat wurde der Agglutiningehalt bestimmt:

Lösung des Euglobulins:

Verdünnung	1:20	1:200	1:500	1:1000	1:2000	1:3000	1:4000	1:6000	1:20 000
a) Agglutination gegen Typhusbakterien . .	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	neg.	neg.	neg.
Verdünnung . .	1:20	1:200	1:300	1:500	1:700	1:900	1:1200	1:1600	1:2000
b) Agglutination gegen Cholerabakterien . .	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	neg.

Filtrat des Euglobulins:

Verdünnung	1:20	1:200	1:2000	1:4000	1:6000	1:8000	1:10000	1:14000	1:16000	1:20000
a) Agglutination gegen Typhusbakterien . .	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	schwache Aggl.
Verdünnung . .	1:20	1:40	1:80	1:120	1:150	1:200	1:1000	—	—	—
b) Agglutination gegen Cholerabakterien . .	Aggl.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	—	—	—

Auch diese Versuchsreihe, welche die Verhältnisse nach der Mischung der Sera verschiedener Tierspezies darstellt, zeigt, dafs die Serumagglutinine in dem Gemenge unverändert bleiben und jede Substanz sich für sich so verhält wie in der ihr adäquaten Serumart. Wir finden auch hier wiederum, dafs das Ziegencholeraagglutinin ausschliefslich die Fällungsgrenzen des Euglobulins beibehält, während das Typhuspferdeagglutinin in seiner Hauptmasse in dem Pseudoglobulin anzutreffen ist. Nur etwa ein Siebentel seines Gehaltes findet sich in dem Niederschlage des Euglobulins.

Dafs auch die verschiedene Höhe der Agglutinationsfähigkeit der beiden Immunsera nicht ins Gewicht fällt, wird — abgesehen von der relativen Verteilung der Agglutinationsfähigkeit, welche, falls die Agglutinationshöhe in Betracht käme, bei beiden Immunkörpern in denselben Verhältnissen erfolgen müfste — durch das Resultat der ersten Versuchsreihe, in der nur ein geringer Unterschied der Agglutinationshöhe der beiden Sera vorhanden war, dargethan. Es mag hier nochmals betont werden, dafs der Gehalt des Euglobulins

an Typhusagglutinin, wie er sich hier vorfand und wie man ihn gelegentlich, insbesondere dann, wenn die Masse des Niederschlages einer Reinigung durch Waschen hinderlich war, noch gröfser antreffen kann, stets durch wiederholtes Lösen und Fällen bis auf geringe Reste entfernt werden kann. Dagegen bewahrt das die Fällungsgrenzen des Euglobulins aufweisende Choleraagglutinin hierbei, innerhalb gewisser Grenzen, seinen vollen Wirkungswert, wie dies schon aus den früheren Versuchsreihen deutlich hervorgeht.

Es ist hier von Interesse, einen Versuch anzuführen, der auf einem anderen Wege zeigt, dafs bereits im normalen Pferdeserum eine Verschiedenheit des Choleraagglutinins und Typhusagglutinins besteht. Bordet hatte mit normalem Pferdeserum Cholerabakterien agglutiniert, den Niederschlag zentrifugiert und die klare überstehende Lösung abermals auf Cholerabakterien einwirken lassen. Er erhielt das seltsame Resultat, dafs diese Flüssigkeit nicht mehr Cholerabakterien agglutinierte, während Typhusbakterien einer exquisiten Agglutination unterlagen. Die Anstellung des Gegenversuches lieferte ein analoges Resultat. Bordet schlofs daraus, dafs beiden verschiedenen Bakterien in demselben Serum verschiedene Agglutinine entsprächen, und dafs die in der Spezifizität der Immunsera sich ausprägenden Differenzen bereits im Keime bei normalen Tieren vorgebildet seien. Wie sehr seine Schlüsse berechtigt waren, beweisen unsere Versuche.

9. Zusammenstellung der bisherigen Ergebnisse.

Über die Verteilung verschiedener Immunkörper im Blute differenter Tiergattungen möge nachstehende Tabelle einen Überblick gewähren:

Immunkörper	Fibrinoglobulin	Euglobulin	Pseudoglobulin	Albumin
Diphtherieantitoxin .	0	Ziege	Pferd	0
Tetanusantitoxin . .	0	(Ziegenmilch ?) (Ehrlich und Brieger)	„	0
Choleralysine Pfeiffer	0	Ziege	0	0
Typhusagglutinine .	0	Ziege, Kaninchen, Meerschweinchen	Pferd	0
Choleraagglutinine .	0	Pferd, Ziege	0	0

Diese Ergebnisse liefern nach den mannigfachsten Seiten beachtenswerte Einzelheiten. Zunächst zeigt sich, dafs die in den verschiedenen Versuchen zur Isolierung einzelner Eiweifskörper aus Gemischen angewandte Methode der Salzfällung

durch die hier gleichzeitig stattfindende Trennung in physiologisch verschieden wirksame Körper, deren Fällungsgrenzen mit denen der Eiweifskörper zusammenfallen, einen neuen Beweis ihrer Zuverlässigkeit erfährt. Der Trennungsversuch von Cholera- und Typhuspferdeagglutinin zeigt dies in anschaulichster Weise. Ähnlich konnte auch Zunz[46]) in jüngster Zeit die seinerzeit von Duclaux[47]) gegen die Methode der stufenweisen Aussalzung erhobenen Einwände entkräften und durch exakte Versuche die abweichenden Schlüsse, welche Duclaux aus seinen Untersuchungen über die Ausfällung der Chininsalze zog, aufklären.

Es ist selbstverständlich, dafs die bisher angeführten Versuche für die chemische Charakterisierung der in Frage stehenden Immunkörper nicht ohne weiteres verwertet werden können. So verführerisch die scharfe Übereinstimmung der Fällungsgrenzen der einzelnen Eiweifskörper mit denen der Immunsubstanzen auch sein mag, so wäre es dennoch wenig berechtigt, daraus auf die Identität beider zu schliefsen. Dafs in der That ein solcher Schlufs zu weitgehend wäre, wird sich aus später angeführten Versuchen ergeben.

Für die Charakteristik der Substanzen scheint dagegen ein anderes Moment verwertbar zu sein. Der Umstand, dafs Körper, deren physiologische Wirkung, wie durch vielfache Erfahrung erprobt ist, stets dieselbe ist, gegenüber ihrem Aussalzungsvermögen bedeutende Unterschiede darbieten, spricht dafür, dafs dieser Unterschied nicht begründet sein kann in einer Verschiedenheit des Aufbaues der physiologisch wirksamen Gruppe. Das Diphtherieantitoxin der Ziege vermag nach unseren bisherigen Erfahrungen in gleicher Weise das Toxin zu neutralisieren wie der vom Pferde stammende Heilkörper, und das Agglutinin des Pferdes wird auf dieselben Typhusbakterien unter sonst gleichen Bedingungen in gleicher Weise einwirken wie das durch Immunisierung der Ziege erhaltene spezifische Serum. Es liegt wohl am nächsten anzunehmen, dafs dieser Unterschied begründet sei in den nicht spezifisch wirksamen Bestandteilen der beiden Körper. Welcher Art diese sind, darüber giebt freilich die Salzfällung keinen Aufschlufs. Alle Versuche, die bisher angestellt worden sind, so insbesondere jene von Brieger und seinen Mitarbeitern Cohn und Boer, die Eiweifskörper der Antitoxine zu entfernen, sind fehlgeschlagen. Auch meine Versuche, nach der von Jacoby[22]) bei der Isolierung des Salizylaldehyd oxydierenden Fermentes befolgten Methode der Uranylacetatfällung das Diphtherieantitoxin von den Eiweifskörpern völlig zu befreien, führten zu keinem befriedigenden Resultate.

Ein weiterer Versuch, das durch Ammonsulfatfällung isolierte Diphtherieantitoxin durch Verdauungsfermente von Eiweifskörpern zu reinigen, wie ihn bereits Belfanti und Carbone[27]) mit dem nicht isolierten Antitoxin unternahmen, ergab nachfolgendes Resultat:

Aus einem ungefähr 60fachen Pferdediphtherieantitoxin wurde durch Salzfällung das Pseudoglobulin dargestellt und so lange dialysiert, bis in dem Schlauchinhalt kein Salz nachzuweisen war. Die Dialyse hatte aufserdem den Zweck, die im Serum eventuell vorhandenen antitryptischen Körper zu entfernen; der nach der Dialyse erhaltene Körper enthielt in 0,1 ccm 300 Antitoxineinheiten. Von dieser Lösung wurden 50 ccm mit Soda alkalisch gemacht und mit einer Messerspitze Grüblerschen Trypsinpräparats, das Fibrin rasch zur Verdauung brachte, und etwas Toluol versetzt. Die Probe wurde am 21. III. 1900 in den Brutschrank eingestellt und nach zwei und fünf Tagen geprüft.

Prüfungsergebnis nach 48stündiger Verdauung bei Annahme eines 300fachen Antitoxingehaltes.

Gewicht des Meerschweinches: 250 g.

0,00033 ccm verd. Antitoxin + 0,07 ccm Di. Tox. (= 10 letale Dosen).

Alles Eiweifs ist koagulabel; das vom koagulierten Eiweifs getrennte Filtrat weist keine Biuretreaktion auf. 23. III. Injektion. 24. III. Tier glatt. 25. III. Hartes Infiltrat. 26. III. Demarkiertes Infiltrat. 27. III. Tier bleibt am Leben.

Prüfungsergebnis nach fünftägiger Verdauung bei Annahme eines 250fachen Antitoxingehaltes.

Gewicht des Meerschweinchens: 260 g.

0,0004 ccm verd. Antitoxin + 0,07 ccm Di. Tox.

Eiweifs ist koagulabel; doch das Filtrat des Koagulums giebt intensive Biuretreaktion und ist mit Ammonsulfatlösung aussalzbar. 26. III. Injektion. 27. III. Bleibt glatt. 1. IV. Glatt; das Tier bleibt gesund.

Die Versuche zeigen, dafs, wiewohl bereits nach fünf Tagen ein Teil des Eiweifses in Verdauungsprodukte aufgespalten worden war, nichts oder nur wenig von der antitoxischen Kraft verloren gegangen war und beweisen so bis zu einem gewissen Grade eine Resistenz des Antitoxins gegenüber Trypsin, wie sie auch Dzierzgowski[42]) fand, wenn er Pankreassaft mit und ohne Galle auf das Antitoxin einwirken liefs. Indes konnte auf Grund einer so kurz dauernden Verdauung die Entfernung der Eiweifskörper nur zum allergeringsten Teile durchgeführt werden, zumal sich unter den neugebildeten Albumosen der gröfste Teil entsprechend den Fällungsgrenzen des Pseudoglobulins wieder aussalzen liefs.

Ich wiederholte daher die Versuche mit einer in gleicher Weise hergestellten Antitoxinlösung, deren Gehalt in 0,1 ccm rund 150 Antitoxineinheiten enthielt. Drei Kölbchen wurden gleichzeitig mit 20 ccm dieser Antitoxinlösung gefüllt und alle in gleicher Weise mit Trypsin, Soda und Toluol beschickt; ein viertes Kölbchen enthielt die gleiche Antitoxinmenge mit Soda und Toluol ohne Trypsin und diente als Kontrolle. Alle Kölbchen wurden gleichzeitig am 28. III. 1 Uhr morgens in den Brutschrank eingestellt.

1. Kölbchen, geprüft nach 36stündiger Verdauung auf den 100fachen Antitoxingehalt.

Gewicht des Tieres: 235 g.

0,001 ccm Antitoxin + 0,07 ccm Di. Tox.

29. III. abends Injektion. 30. III. Bleibt glatt. 31. III. Kleiner harter Strang. 1. IV. Glatt. 2. IV. Glatt; das Tier bleibt normal.

2. Kölbchen, geprüft nach neuntägiger Verdauung auf den 100fachen Antitoxingehalt.

Gewicht des Tieres: 270 g.

0,001 ccm Antitoxin + 0,07 ccm Di. Tox.

Die Lösung enthält reichlich tyrosinähnliche Krystalle und ist nur zum geringsten Teile koagulabel. 6. III. Injektion. 7. III. Hartes Infiltrat. 8. III. †; Toxintod.

2. Kölbchen, geprüft nach neuntägiger Verdauung auf den 90fachen Antitoxingehalt.
(Vom 6. IV. an in der Kälte aufbewahrt.)

Gewicht des Meerschweinchens: 245 g.

0,00111 ccm Antitoxin + 0,07 ccm Di. Tox.

10. IV. Injektion. 11. IV. Weiches Infiltrat. 12. IV. Weiches Infiltrat. 13. IV. †; Toxintod.

2. Kölbchen, geprüft nach neuntägiger Verdauung auf den 50fachen Antitoxingehalt.
(Vom 6. IV. an in der Kälte aufbewahrt.)

Gewicht des Tieres: 230 g.

0,002 ccm Antitoxin + 0,07 ccm Di. Tox.

10. IV. abends Injektion. 11. IV. Glatt; Tier ist dyspnoisch. 12. IV. Kein Infiltrat; Tier sehr stark dyspnoisch. 13. IV. †; Toxintod.

3. Kölbchen, verdaut vom 28. III. bis 30. IV. und geprüft auf den 50fachen Antitoxingehalt.

Gewicht des Tieres: 220 g.

0,002 ccm Antitoxin + 0.07 ccm Di. Tox.

2. V. Injektion. 3. V. Glatt. 4. V. Harter Strang. 5. V. †; Toxintod.

1. Kölbchen vom 30. III. bis 25. V. bei Zimmertemperatur verdaut und auf den 100fachen Antitoxingehalt geprüft.

0,001 ccm Verdg.-Gemisch + 0,08 ccm Di. Tox. (= 10fach letale Dosen). Die Lösung enthält eine grofse Menge tyrosinähnlicher Krystalle. 25. V. Injektion. 26. V. Weiches Infiltrat. 27. V. †; Toxintod.

3. Kölbchen. Injektion der Lösung ohne Toxinmischung.

Tiergewicht: 210 g.

0,002 ccm Antitoxin + 1 ccm 0,6proz. NaCl.

5. V. Injektion; das Tier bleibt normal.

4. Kölbchen (Kontrollkölbchen). Prüfung auf den 100fachen Antitoxingehalt.

Gewicht des Tieres: 250 g.

0,001 ccm Antitoxin + 0,08 ccm Di. Tox.

Die Lösung bleibt bis zum 15. IV. im Brutschrank und hierauf bis zum 25. V. bei Zimmertemperatur stehen.

25. V. Injektion. 26. V. Glatt. 27. V. Glatt. 28. V. Glatt; das Tier bleibt gesund.

Man ersieht aus den angeführten Protokollen, dafs eine neuntägige Verdauung, während welcher der gröfste Teil des Eiweifses gespalten worden war, auch zwei Drittel des Antitoxingehaltes sicher vernichtete, während die Kontrollprobe noch nach mehr als $1^1/_2$ Monaten beinahe den vollen Antitoxingehalt aufwies. Mit der schrittweisen Aufspaltung und Veränderung des genuinen Eiweifses geht daher auch eine mehr oder minder starke Abnahme des Antitoxingehaltes einher. Immerhin ist es denkbar und durchaus nicht im Widerspruch mit der Eiweifsnatur des Antitoxins, dafs die antitoxische Gruppe länger dem Abbau durch das tryptische Ferment widersteht als zahlreiche andere im Pseudoglobulin enthaltene Atomcomplexe. Mit dem völligen Abbau jedoch aller genuinen Eiweifskörper scheint auch der Antitoxingehalt völlig vernichtet zu werden.

Sprechen schon diese Versuche sehr für die Eiweifsnatur des Diphtherieantitoxins, so konnte Ransom[3]) in neuerer Zeit ein im gleichen Sinne zu deutendes Resultat auf anderem Wege erhalten. Gelegentlich von Studien, welche die Verteilung des Tetanustoxins und Antitoxins im Blut und in der Lymphe betrafen, konnte er zeigen, dafs, während sich das Tetanustoxin nach Einführung in die Blutbahn von Hunden so verhielt wie die normalen anorganischen Bestandteile des Blutlymphkreislaufs, das Tetanusantitoxin des Pferdes unter denselben Bedingungen den Proteinstoffen des

Blutlymphkreislaufs folgt. Man dürfte kaum fehlgehen, wenn man gerade jene Bestandteile, welche die Verschiedenheit der Salzfällung bei sonst identischen spezifischen Wirkungen der Körper bedingen, für das Verhalten der Antitoxine beim Durchtritt der lebenden Gefäfswand sowie für das übrige physikalische Verhalten dieser Körper verantwortlich macht und ihnen zumindest einen kolloiden Charakter zuschreibt.

Mit gröfserer Sicherheit als über die Natur dieser Bestandteile läfst sich ein Schlufs ziehen über das Verhältnis der wirksamen Gruppe zu den die Verschiedenheit der Salzfällung bedingenden Körpern. Aus der Bestimmung der Fällungsgrenzen in den einzelnen Serumarten und aus dem Umstande, dafs bei einer Vermischung der Sera verschiedener Thierspezies (Ziege und Pferd) keine Verschiebung der Fällungsverhältnisse eintritt, geht mit Sicherheit hervor, dafs diese Körper zu integrierenden Bestandteilen der spezifisch wirksamen Gruppe im Serum gehören, dafs sie in irgend einer wie immer gearteten Verbindung mit ihr stehen müssen. Wir haben daher in diesem Sinne uns die im Blute kreisenden Antitoxine und Agglutinine nicht etwa nur aus bei allen Tieren gleichartigen, freien, wirksamen Gruppen zusammengesetzt zu denken, sondern uns ihre Natur durch den Eiweifshaushalt des Organismus in der mannigfachsten Weise beeinflufst vorzustellen und damit durch den intermediären Stoffwechsel, der die Tierart und vielleicht das Individuum charakterisiert. Denn gerade die Arbeiten der jüngsten Zeit lehren, dafs auch die individuelle Variation bei den verschiedensten Tierarten eine grofse Rolle spielt, und es wären in dieser Beziehung über die Verteilung der Immunkörper noch weitere Erfahrungen abzuwarten.

Die Verschiedenheit der einzelnen Bestandteile des Gesamtkomplexes bedingt selbstverständlich, dafs auch dieser, als Ganzes genommen, von einem zweiten, physiologisch identischen Gesamtverbande zu unterscheiden sein wird. Es mufs demnach das Antitoxin der Ziege als anders charakterisiert gelten als das Antitoxin des Pferdes, das Typhusagglutinin des Pferdes stellt einen anderen Körper dar als das Typhusagglutinin der Ziege, und ebenso ist das Pferdecholeraagglutinin neben seiner Spezifizität auch durch sein differentes chemisches Verhalten als vom Typhusagglutinin des Pferdes verschieden zu charakterisieren. Diese Thatsachen, die bezüglich der Antitoxine und Bakterienagglutinine hier auf einem bisher nicht eingeschlagenen Wege zum erstenmal begründet erscheinen, sind, wenigstens was die Antitoxine betrifft, schon

früher vermutet worden. Die ältesten Angaben darüber finden sich bei Tizzoni[30a]), der auf Grund seiner Untersuchungen ausführt, „dafs das Tetanusantitoxin, welches im Blutserum von gegen Tetanus immunisierten Kaninchen enthalten ist, durch die Stärke seiner Wirkung oder durch seine Zusammensetzung von dem Antitoxin, das im Blutserum tetanusimmuner Hunde vorkommt, verschieden sein mufs. Sollte es mir (Tizzoni) bei Fortsetzung dieser Untersuchungen gelingen, den Nachweis zu führen, dafs das Tetanusantitoxin des Hundes von dem des Kaninchens verschieden ist, so wäre damit bewiesen, was heute nur wahrscheinlich ist, dafs in Tierarten, welche ungleich empfindlich sind, verschiedene Antitoxine vorkommen". Dieser aus der Anfangsära der Antitoxinforschung stammenden Angabe steht anscheinend eine Beobachtung von Brieger und Boer, wenngleich nicht direkt, entgegen. Diese mit Tetanusantitoxin der Ziege und Diphtherieantitoxin der Kuh und des Pferdes experimentierenden Autoren achteten darauf, ob die Verschiedenartigkeit des Serums auch Unterschiede in der Leistungsfähigkeit der Methoden zur Gewinnung der Antitoxine bedingt, und konnten sich überzeugen, dafs die Herkunft des Serums die Brauchbarkeit ihrer Verfahren nicht beeinträchtigt; sie fanden in allen Fällen die mit den Globulin fällenden Reagentien erhaltenen Niederschläge wirksam *).

In letzter Zeit sind dank den Arbeiten Ehrlichs[1]) und seiner Mitarbeiter unsere Kenntnisse in der Immunitätslehre ungemein gefördert worden und wir wissen aus den zahlreichen Untersuchungen über Hämolysine und Blutkörperchenagglutinine, dafs die Wahl der Tierart für die Art der Einwirkung der wirksamen Substanz ausschlaggebend ist. Die zahlreichen Beobachtungen, wie die Versuche von Ehrlich und Morgenroth[1]) über Hämolysine und die von Bordet[39]) und Malkoff[43]) über normale Blutkörperchenagglutinine haben den Nachweis erbracht, dafs in einem und demselben Serum viele Immunkörper (Rezeptoren) vorhanden sind, deren Verschiedenheit nur durch die spezifische Einwirkung (Verankerung) auf eine bestimmte Blutart gegeben ist. Wiewohl diese Befunde, die Ehrlich zu seiner pluralistischen Auffassung der Rezeptoren veranlafsten, von den hier vorliegenden vorläufig wenigstens zu scheiden sind, so stehen sie dennoch in vielfacher Analogie zu jenen und lassen sich unter den von Ehrlich angegebenen Gesichtspunkten weiter verfolgen.

*) Siehe S. 13, Anmerkung.

Die Bildung verschiedener Antikörper in unserem Sinne unter dem Einflusse eines und desselben Giftes könnte wohl weiter zu der Annahme führen, dafs die Einwirkung des letzteren auf verschiedene Organzellen oder Zellbestandteile erfolgt war und die Differenzierung der Antikörper, wie sie sich in der verschiedenen Aussalzbarkeit kundgiebt, nichts anderes ist als der Ausdruck der verschiedenen Abstammung derselben. Diese Annahme scheint unter den sonst möglichen den höchsten Grad der Wahrscheinlichkeit für sich zu besitzen und es sollen weitere Untersuchungen in dieser Richtung noch ergeben, inwieweit diese oder eine andere Deutung den thatsächlichen Verhältnissen der Immunisierung entspricht; ebenso wird auch zu untersuchen sein, ob der an sich nicht spezifisch wirksame Bestandteil auf die Wirksamkeit der spezifischen Gruppe im Sinne mannigfacher Nebenwirkungen von Einfluſs sein kann. Dafs ein solcher die physikalischen Eigenschaften und wohl auch die chemischen des Komplexes beeinflussen kann, haben wir bereits gesehen; dafs er aber auch für die physiologische Wirkung von Belang sein könnte*), beweist der Umstand, dafs die Antitoxine verschiedener Tierarten in ihrer Affinität zum entsprechenden Gifte eine grofse Verschiedenheit aufweisen, ein Moment, das neuerdings sogar praktische Bedeutung erlangt hat. [Siehe Behring und Kitaschima[44]), Wassermann[45]).]

Bei Betrachtung der oben angeführten Tabelle ist es endlich auffallend, dafs sich in den untersuchten Fällen niemals irgend eine Beziehung der Immunkörper zu den Albuminen finden liefs und auch nicht zu dem Fibrinoglobulin. Stets waren die Immunkörper nur an die Fällungsgrenzen eines der beiden Globuline gebunden; auch von anderen Autoren konnten solche Beziehungen (mit dem Serumalbumin vor allem) auch bei anderen durch Immunisierung erzeugten Stoffen bisher nicht einwandsfrei konstatiert

*) Dafs der physiologische Charakter des ganzen Komplexes ungemein beeinflufst wird durch eine Änderung innerhalb des Moleküls, selbst wenn die wirksame Gruppe des Körpers völlig intakt bleibt, läfst sich natürlich in zahlreichen Beispielen darthun. Ich erinnere hier an die Abhängigkeit der Farbstoffbildung von dem Eintreten saurer oder basischer Gruppen in das Molekül bei gleicher chromophorer Gruppe (Braunfärbung des Oxyazobenzols, Gelbfärbung des Amidoazobenzols), ferner an die Abhängigkeit gewisser Wirkungen von der Molekulargröfse der betreffenden Stoffe, so an die Veränderung der Giftwirkung der einwertigen Alkohole mit der Anzahl der Kohlenstoffatome und ebenso an die ungeheuere Abnahme der Giftigkeit der Dinitrile durch Einschaltung von CH_2-Gruppen zwischen die wirksamen Gruppen (Heymans und Massin) u. a.

werden*). Es dürfte hier gestattet sein, daran zu erinnern, dafs auch bei Immunisierung von Kaninchen mit einzelnen Eiweifskörpern des Pferdes, sofern die Angaben von Nolf[48]) zurecht bestehen, nur Globuline eine Immunität zu erzeugen im stande sind, während Albumine unter gleichen Verhältnissen unwirksam bleiben.

Diese Beobachtung Nolfs hatte mich veranlafst, zu untersuchen, ob nicht etwa eines der drei im Pferdeserum vorhandenen Globuline allein im stande wäre, bei einer Immunisierung von Kaninchen Präzipitine zu erzeugen. Indes lehrten die Versuche, dafs alle drei Globuline im stande waren, bei Immunisierung durch subkutane und intraperitoneale Injektion innerhalb kurzer Zeit Immunkörper zu erzeugen; es haben indessen auch die von anderer Seite vorgenommenen Untersuchungen gelehrt, dafs die verschiedensten, in ihren chemischen Eigenschaften durchaus abweichenden Eiweifskörper, wie Kasein, krystallisiertes Eieralbumin[67]), Fibrin, Wittepepton und Pflanzeneiweifskörper, bei Immunisierung im Kaninchenorganismus Präzipitine hervorzurufen vermögen. Vor kurzem berichtete Ide[49]) in einer vorläufigen Mitteilung, dafs auch „chemisch reines Albumin" des Kuhserums bei längerer Behandlung der Kaninchen Substanzen liefere, welche Albumin in vitro ausfällen. Betreffs seiner gleichzeitigen Angaben, dafs die Agglutinine die Antikörper der leicht fällbaren Eiweifsstoffe, während die Antitoxine die Antikörper der weniger leicht fällbaren Substanzen seien, mufs wohl erst die ausführliche Publikation abgewartet werden.

Für die Beurteilung der physiologischen Bedeutung der Eiweifskörper des Blutserums ist aber von Wichtigkeit, ob man die beobachteten physiologischen Wirkungen ihnen als solchen zukommend ansehen darf oder aber nur als Folge des Anhaftens kleiner Mengen höchst wirksamer Stoffe von kolloider Natur und einer den bestimmten Eiweifsfraktionen nahestehenden Aussalzbarkeit. Ob man sich nun der einen oder der anderen Annahme zuneigt, jedenfalls weist der Unterschied in der Wirksamkeit bestimmter Fraktionen, so die physiologische Verschiedenheit der Euglobuline des Pferdes einerseits, der Ziege und des Kaninchens und Meerschweinchens anderseits auf eine Verschiedenheit des intermediären Stoffwechsels hin, welche, wie in anderen Erscheinungen, auch in der Bildung verschiedener Antikörper zum Ausdruck kommt.

---

*) Die hierher gehörigen Angaben sind zumeist beeinflufst durch die unvollständige Ausfällung der Globuline, sei es durch verdünnte Säuren oder durch Dialyse, so jene von Emmerich und Tsuboi[46]), welche glaubten, den „Albuminen" einzig und allein die bei mit Schweinerotlauf immunisierten Kaninchen vorgefundene Heilsubstanz zuschreiben zu dürfen. In ähnlicher Weise dürften auch die Angaben Buchners[12]) über das Verhalten der bakteriziden Substanzen im Kaninchen- und Hundeserum und jene von Landsteiner[4]) über die an der Auflösung von fremden Blutkörperchen beteiligten Körper einer Nachprüfung mit zuverlässigeren Methoden wert sein.

XXVI.

Zur Kenntnis der Immunkörper.

Zweite Mitteilung.

Über die bei der Agglutination und der spezifischen Niederschlagsbildung (Kraus) beteiligten Substanzen.

Von Dr. **Ernst P. Pick.**

[Aus dem k. k. serotherapeutischen Institut zu Wien (Vorstand: Prof. Dr. R. Paltauf) und dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolfstiftung" (Vorstand: Dr. E. Freund).]

Von dem mir zur Verfügung stehenden Material der Sera immunisierter Tiere boten einer weiteren chemischen Bearbeitung die Sera von typhus- und choleraimmunisierten Pferden die relativ günstigsten Bedingungen dar. Insbesondere das Grubersche[35]) Agglutinationsphänomen und das der spezifischen Niederschlagsbildung nach Kraus[50]), dessen chemische Untersuchung hier auf den Rat des Herrn Professors Paltauf ins Auge gefafst wurde, erwies sich aus vielerlei Gründen besser einer Bearbeitung zugänglich als etwa die noch immer in vielen Punkten der Aufklärung harrende Einwirkung der Antitoxine auf die entsprechenden Gifte; dazu kam die Möglichkeit, ohne Tiermaterial in vitro die Reaktionen verfolgen zu können, und andererseits auch der Umstand, dafs aus der Vereinigung des Immunkörpers mit der die Immunität auslösenden Substanz ein neues Produkt gebildet wird, das zu einer näheren Charakterisierung direkt herausforderte. Es waren dementsprechend die Untersuchungen zu richten: 1. auf die Bakterienprodukte, welche die Bildung der Immunkörper im Organismus bewerkstelligen, 2. auf die im Serum enthaltenen Immunkörper, 3. auf das durch die Einwirkung dieser beiden Körper aufeinander entstehende Produkt und die Bedingungen seiner Bildung. Die

Versuche wurden hauptsächlich am Typhusimmunpferdeserum, zum Teil an Typhusimmunziegenserum und Choleraimmun-Pferdeserum angestellt.

1. Untersuchungen über die an der Agglutination und Niederschlagsbildung beteiligten Bakterienprodukte.

Bevor an die Untersuchung der spezifischen Immunkörper herangetreten werden konnte, war es nötig, sich darüber zu orientieren, welche davon in den Kulturflüssigkeiten von Typhusbakterien und welche in den Bakterienleibern selbst enthalten sind und an der hier zu verfolgenden Reaktion Anteil nehmen. Die von vielen Autoren festgestellte Resistenz gegen Einwirkung chemischer Mittel war für die weitere chemische Bearbeitung der spezifischen Substanzen günstig. So hatte bereits Bordet[51]), Widal und Sicard[36]) sowie van de Velde[51]) gezeigt, dafs die durch verschiedene Reagentien, wie Chloroform, Thymol, Phenol, Sublimat und Formol, sowie durch Hitze abgetöteten Bakterien das Phänomen der Agglutination wie lebende Bakterien zeigen; Nicolle[52]), der sich als erster gründlich mit der Untersuchung der agglutinierbaren Substanz der Coli-, Typhusbakterien, des Vibrio Massauah beschäftigte, konnte deren grofse Widerstandsfähigkeit ebenfalls darthun.

Das erste Ziel meiner Untersuchungen sollte darin bestehen, festzustellen, ob die in den Kulturen vorhandene, an der Agglutination oder Niederschlagsbildung beteiligte Substanz einheitlich ist, oder ob durch den Lebensprozefs der Bakterien mehrere solcher Produkte gebildet werden. Die Entdeckung der selbstverdauenden Enzyme, wie sie in Form der Autodigestion Salkowskis[53]) für die Organzellen schon lange gegeben ist, in der Hefezelle und analoger Endoenzyme beim Tuberkel und Typhusbacillus durch M. Hahn[54]) legte diesen letzteren Gedanken besonders nahe. Stellen doch die alten Kulturflüssigkeiten, so speziell alte Typhusbouillon, in deren sterilen Filtraten Kraus als Auslaugungsprodukte der Bakterienleiber die „präzipitablen“ Substanzen nachweisen konnte, ein klassisches Objekt für die Entwickelung solcher Selbstverdauungsvorgänge dar. Auch Nicolle giebt an, dafs die Produktion der „agglutinierbaren“ Substanzen geknüpft zu sein scheint an den Zerfall der Mikroben und um so reichlicher stattfindet, je älter die Kulturflüssigkeit ist. In einem gewissen, bisher nicht weiter beachteten Gegensatze zu diesen

Thatsachen steht jedoch der Umstand, dafs gerade junge Kulturen der wirksamen Extraktion mit allerlei Reagentien am besten zugänglich sind. So konnte Nicolle gerade die Coli- und Typhusbakterienleiber aus jungen Bouillonkulturen einer wirksamen Extraktion (Mazeration) mit absolutem Äther und Alkohol unterziehen. Die Angaben Winterbergs, dafs die agglutinierbare Substanz mit einem Überschusse von Alkohol stets fällbar sei, beziehen sich auf alte Kulturflüssigkeiten und sind wohl nicht mit denen von Nicolle ohne weiteres vergleichbar. In der That kann man sich leicht überzeugen, dafs wässerige Aufschwemmungen von zwei- bis dreitägigen Typhusagarkulturen nach ihrer Filtration durch Thonfilter ungleich reicher sind an einer Substanz, die mit Immunserum unter Niederschlagsbildung reagiert, als etwa solche von Agarkulturen, die mehrere Wochen lang der Brutwärme ausgesetzt waren. Diese bequeme Trennungsmethode, deren wir uns später vielfach bedienten, steht im augenfälligen Gegensatz zu jener, die Kraus anwenden mufste, indem er bei einem Drucke von 300 Atmosphären aus Zellleibern die wirksame Substanz darstellte. Alle diese Überlegungen führten dahin, dafs entsprechend der Lebensthätigkeit der Bakterien und der mannigfachsten dabei mitspielenden Fermentationsprozesse nicht nur ein einziger Körper, sondern mehrere, voneinander verschiedene an dem Phänomen der Agglutination oder Niederschlagsbildung beteiligt sind.

a) Darstellung und Charakteristik der Bakterienkoaguline A und K.

Ein Liter einer etwa zwei*) Monate alten, durch ein Pukallsches Thonfilter getriebenen Typhusbouillonkultur wurde mit dem sechsfachen Volumen 95prozentigen Alkohols gefällt, die Lösung über Nacht stehen gelassen und der aus dichten braunen Flocken bestehende Niederschlag auf ein Filter gebracht. Der Niederschlag wurde gut abgepreſst und bei Zimmertemperatur trocknen gelassen. Die Substanz stellte eine bräunliche, an der Luft stark hygroskopische Masse vor, die dann zu einem festen Firnis eintrocknete; diese Masse wurde in 250 ccm Wasser gelöst. Die Lösung erfolgte rasch und vollständig zu einer dunkelbraunen

*) Ich verdanke diese sowie eine gleich alte, jedoch unwirksame Cholerakultur meinem Kollegen, Herrn Priv.-Doc. Dr. Kraus, wofür ich meinen besten Dank abstatte.

klaren Flüssigkeit, die neutral reagierte und die üblichen Albumosenreaktionen gab. Das alkoholische Filtrat wurde im Vakuum bei 40° eingedampft, der Trockenrückstand in Wasser aufgenommen und beide Flüssigkeiten mit einem Typhusimmunserum auf den Gehalt an „spezifisch präzipitablen" Substanzen geprüft. Während die aus dem Alkoholniederschlage stammende Lösung bereits innerhalb zweier Stunden bei Zimmertemperatur unter reichlicher Niederschlagsbildung reagierte, erwies sich die aus dem alkoholischen Filtrate erhaltene, entsprechend den bereits von Winterberg gemachten Angaben als völlig unwirksam.

Ich habe die in der beschriebenen Weise wiederholt dargestellte wirksame, durch Alkohol fällbare Substanz der alten Typhusbouillonfiltrate als Bakterienkoagulin A bezeichnet. Die Lösung A enthielt kein durch Hitze koagulables Eiweifs, zeigte aber mit verdünnter Essigsäure bisweilen eine recht reichliche Fällung; die Lösung eines solchen mit verdünnter Essigsäure erzeugten Niederschlages in schwacher Soda wies indes keine spezifischen Eigenschaften auf; weiter gab die Lösung eine schöne rotviolette Biuretreaktion, ebenso typische Millonsche Reaktion und enthielt sowohl bei $^1/_2$ wie bei $^2/_3$ und voller Ammonsulfatsättigung aussalzbare Albumosen. Dementsprechend wurde ein Teil der Lösung mit festem, feingepulvertem Ammonsulfate gesättigt, die abgeschiedenen Albumosen filtriert, der Niederschlag abgepreſst, nochmals in Wasser gelöst und abermals wie früher ausgesalzen, mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und nach sorgfältigem Abpressen in Wasser gelöst. Während sich der nach der ersten Fällung erhaltene Niederschlag noch als schwach wirksam erwies, war die nach der zweiten Fällung erhaltene Lösung völlig unwirksam. Es konnte daher die an der Niederschlagsbildung beteiligte Substanz nicht den Albumosen angehören, sondern im ammonsulfatgesättigten Filtrat enthalten sein. Aus diesem wurde zunächst durch wiederholten Zusatz von 95prozentigem Alkohol in einzelnen Fraktionen das überschüssige Ammonsulfat entfernt und endlich mit einem grofsen Überschufs von Alkohol neben Resten von Ammonsulfat ein Körper in geringer Menge ausgefällt, der sich in klebrigen, schleimigen Massen absonderte und von den Ammonsulfatkrystallen leicht mechanisch zu trennen war. Bereits die Prüfung des ammonsulfatgesättigten Filtrates ergab den negativen Ausfall der unter den sorgfältigsten Kautelen ausgeführten Biuretreaktion. Die wässerige Lösung des nunmehr erhaltenen Niederschlages zeigte keine Biuretreaktion, wohl aber eine deutliche Rotfärbung der Flocken bei Anstellung

der Reaktion nach Millon. Diese Lösung bildete auf Zusatz des gleichen Volumens des Typhusimmunserums schon bei Zimmertemperatur in kurzer Zeit einen typischen Niederschlag. Es folgt daraus, dafs die wirksame Substanz, wenn überhaupt, nur den weit abliegenden Eiweifsspaltungsprodukten, sicher nicht den Albumosen und wahrscheinlich auch nicht den Peptonen angehört.

Dieses Resultat ist am bequemsten dann zu erzielen, wenn man sich einer Bouillon bedient, in der während eines zwei- oder dreimonatlichen Stehens im Brutschrank durch die in der Kultur wirksamen proteolytischen Fermente die Spaltung der sonst die Untersuchung störend beeinflussenden Eiweifskörper eine weit fortgeschrittene ist. Untersucht man in gleicher Weise jüngere Bouillonkulturen, selbst 14 Tage alte, so gelingt es nicht, die Albumosen zu entfernen, ohne einen grofsen Teil der an der Niederschlagsbildung beteiligten Substanz einzubüfsen, ein Verhalten, das in ähnlicher Weise Brieger[55]) bei Isolierung des Tetanus- und Choleragiftes beobachtete, die beide nur in jüngeren Kulturen durch Ammonsulfat aussalzbar sind, während in alten, besonders giftigen Kulturen infolge eingetretener Spaltung der Albumosen die Ammonsulfatfällung völlig unwirksam wird; in diesen Fällen beobachtet man ebenfalls das Zurücktreten der Biuretreaktion.

Andererseits wurde in folgender Weise ein neues Produkt gewonnen. Mehrere drei Tage alte Typhusagarstrichkulturen des gleichen Typhusstammes, mit dem die Bouillonkultur angelegt worden war, wurden in 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und diese Lösung durch ein steriles Pukallfilter gejagt. Die stets so dargestellte Lösung war farblos (zuweilen mit einem Stich ins Gelbliche), reagierte neutral oder ganz leicht alkalisch und lieferte, mit dem Typhusimmunserum versetzt, sofort eine Trübung, die sich unter den Augen des Beobachters zu einem dichten feinflockigen Niederschlage innerhalb weniger Minuten bis einer halben Stunde umsetzte. Die so gewonnene Substanz wurde als Bakterienkoagulin K (Kochsalzextrakt) bezeichnet.

Eiweifsreagentien gegenüber verhielt sich die Lösung folgendermafsen: Die Biuretreaktion blieb negativ, zumeist auch die Millonsche Reaktion, ebenso vermochten Alkaloidreagentien, wie Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Jodquecksilberkalium und Salzsäure, Kaliumwismutjodid, Tannin, Pikrinsäure, keine Fällung hervorzubringen, ebenso wenig Uranacetat und Kobaltnitrat. Der Zusatz von 95prozentigem Alkohol brachte keine Fällung hervor. Auch die Anstellung der Reaktion nach Molisch, selbst nach Kochen mit verdünnter Salzsäure, und die Schwefelbleiprobe lieferten ein negatives Resultat.

Hingegen konnte mit Bleizucker im Überschusse eine schöne flockige Fällung erhalten werden. Dieses Verhalten wurde zu einem Reinigungsversuch auch bei anderen Präparaten benutzt. Der aus einer Lösung mit Bleizucker gefällte Niederschlag wurde mit Wasser so lange gewaschen, bis im Filtrate keine Biuretreaktion mehr nachweisbar war; der gereinigte Niederschlag wurde mit schwacher Sodalösung digeriert, von dem ungelöst gebliebenen Anteil abfiltriert und die so erhaltene opaleszente Lösung im Pergamentschlauch dialysiert. Die wirksame Substanz passierte nur zum geringsten Teil die Membran. Der Schlauchinhalt erzeugte im homologen Immunserum nach kurzer Zeit einen Niederschlag, während er im normalen oder Choleraimmunpferdeserum keine Veränderung hervorbrachte. Er wurde auf dem Wasserbade bis zur Trockene eingedampft und der Trockenrückstand auf dem Platinblech verascht, wobei deutlicher Geruch nach sublimierendem Leucin auftrat.

Ganz anders jedoch verhielt sich eine Lösung die aus Kulturen gewonnen war, welche 14 Tage und länger im Brutschrank belassen wurden. Sie war stets von gleichzeitig extrahierten Produkten des Nährbodens gelb gefärbt und wies dementsprechend allerlei Eiweifsreaktionen auf, und zwar sowohl die Biuretreaktion, die Millonsche Reaktion, wie auch Fällbarkeit mit verschiedenen Alkaloidreagentien. Diesen beiden Extremen entsprechend konnte man bei Präparaten der verschiedensten Darstellung, je nachdem die Extrakte mit mehr oder weniger Zersetzungsprodukten des Nährbodens und zum Teil wohl auch den Zerfallsprodukten der Bakterienleiber verunreinigt waren, einen verschiedenen Verlauf der Reaktionen beobachten. So sah man zuweilen, dafs vorsichtiger Zusatz von Essigsäure eine Opaleszenz erzeugte, und auch der nach Eindampfen einer solchen Lösung und Veraschen mit Soda und Salpeter vorgenommene Phosphornachweis durch Fällung mit Ammoniummolybdat ergab ein positives Resultat. Indes konnte wiederum in anderen reineren, gut wirksamen Präparaten Phosphor entweder überhaupt nicht oder nicht sicher aufgefunden werden. Es war also der positive Ausfall bald dieser bald jener Reaktion für die Charakteristik des wirksamen Körpers nicht verwertbar.

Der negative Ausfall der für das Vorhandensein eines Eiweifskörpers mafsgebenden Reaktionen spricht dafür, dafs auch hier die wirksame Substanz kein Eiweifskörper im gewöhnlichen Sinne, weder eine Albumose, noch ein Pepton oder Nukleoproteid sein kann.

In gleicher Weise wie aus Typhusagarkulturen liefs sich der Körper darstellen, wenn Gelatine, Kartoffel oder Milch als Nährboden zur Verwendung kamen.

Sowie die „agglutinierbare“ Substanz der Typhusbakterien

gegen Einwirkung der verschiedensten Reagentien eine aufserordentliche Widerstandsfähigkeit zeigt, so konnte auch bei dem Bakterienkoagulin A und K eine ähnliche Resistenz nachgewiesen werden. Beide Substanzen konnten 5 bis 10 Minuten in dem Reagenzglas über freier Flamme gekocht werden, ohne etwas von ihrer Wirksamkeit einzubüfsen, ebenso vermochte Fäulnis beide Substanzen in keiner Weise zu schädigen. Die Einwirkung von Alkohol und Äther selbst in der Hitze verlief entweder spurlos oder verminderte nur sehr wenig die Wirksamkeit beider Substanzen. Eine mehrere Wochen lang währende Verdauung beider Substanzen mit Pepsin-HCl und Trypsin-Soda hatte keinerlei augenfällige Veränderung der Wirksamkeit zur Folge. Doch geradezu staunenswert ist, dafs selbst die Einwirkung von Säure und Alkali in der Hitze kaum die physiologische Wirkung zu beeinflussen vermag, wie ich bezüglich des Bakterienkoagulins A in zwei Versuchen zu beobachten Gelegenheit hatte.

2 ccm desselben wurden durch einige Minuten mit 16prozentiger Salzsäure über freier Flamme gekocht, die Flüssigkeit unter der Wasserleitung abgekühlt, mit Soda neutralisiert und geprüft:

	Nach 12stündigem Stehen im Brutschrank
1 ccm Bakterienkoagulin A + 1 ccm Typhusimmunserum	massiger, grobflockiger Niederschlag.
1 ccm Bakterienkoagulin A + 1 ccm Choleraimmunserum	bleibt klar.

2 ccm des gleichen Bakterienkoagulins werden mit einigen Tropfen konzentrierter Natronlauge versetzt, einige Minuten über freier Flamme gekocht, abgekühlt und mit Essigsäure neutralisiert:

	Nach 12stündigem Stehen im Brutschrank
1 ccm Bakterienkoagulin A + 1 ccm Typhusimmunserum	massiger, grobflockiger Niederschlag.
1 ccm Bakterienkoagulin A + 1 ccm Choleraimmunserum	bleibt klar.

Die unerwartete Resistenz eines so hervorragend physiologisch wirksamen Körpers drängt unwillkürlich zu einem Vergleich mit Körpern ähnlicher Resistenz und hoher physiologischer Wirkung, wie sie in Gestalt der häufig recht widerstandsfähigen Zymogene als Vorstufen von labileren Fermenten angetroffen werden.

b) Trennung der Bakterienkoaguline A und K durch Alkoholfällung.

Während, wie schon früher bemerkt wurde, das Bakterienkoagulin A aus der Bouillon stets mit einem Alkoholüberschusse vollkommen abgeschieden werden konnte, zeigte der Körper K, gewonnen sowohl aus alten wie aus jungen Kulturen, ein völlig anderes Verhalten gegen Alkohol. Die Extrakte junger Kulturen, die nicht durch Zerfallsprodukte des Nährbodens verunreinigt waren, zeigten selbst auf Zusatz des zehnfachen Volumens absoluten Alkohols keine Fällung, auch nicht bei tagelangem Stehen. Präparate älterer Kulturen verhielten sich gegen Alkohol, wie folgender Versuch zeigt:

250 ccm eines wirksamen Kochsalzextraktes einer zehn Tage alten Typhusagarkultur werden mit dem zehnfachen Volumen absoluten Alkohols gefällt; es entsteht ein spärlicher feinflockiger Niederschlag (I). Nach zweistündigem Stehenlassen ward derselbe filtriert, das alkoholische Filtrat auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 25 ccm Wasser gelöst. Eine Probe dieser Lösung erzeugt im spezifischen Immunserum sofort einen Niederschlag. Diese Lösung wird zum zweitenmal mit dem zehnfachen Volumen absoluten Alkohols versetzt; es entsteht jetzt keine Fällung mehr, auch nicht nach mehrstündigem Stehen der leicht mit Na Cl salzhaltig gemachten Lösung. Die durch Eindampfen dieser alkoholischen Lösung und Aufnahme des Trockenrückstandes in Wasser erhaltene Flüssigkeit zeigte ungeschwächte Reaktionskraft in dem homologen Immunserum. Ein Teil des Trockenrückstandes wurde behufs Extraktion mit 95prozentigem Alkohol mehrere Stunden hindurch bei Zimmertemperatur digeriert, das klare alkoholische Extrakt auf dem Wasserbade eingedampft und der Rückstand in wässeriger Lösung mit Typhusimmunserum geprüft. Derselbe erzeugte in kurzer Zeit bei Zimmertemperatur einen Niederschlag. Es folgt aus diesen Versuchen, dafs ein grofser Teil der wirksamen Substanz in die alkoholische Lösung übergegangen war und auch durch Extraktion mit 95prozentigem Alkohol gewonnen werden konnte. Jedoch auch der nach der ersten Alkoholfällung erhaltene geringe Niederschlag (I) zeigte gute spezifische Wirksamkeit.

Zur Entscheidung der Frage, ob dieser Teil nur mechanisch mitgerissen worden war, wurde der getrocknete Niederschlag in wässerige Lösung gebracht und abermals mit dem zehnfachen Volumen absoluten Alkohols gefällt; es entstand wiederum eine Fällung; das von dieser abfiltrierte klare alkoholische Filtrat wurde auf dem Wasserbade bis zur Trockne eingedampft und die wässerige Lösung des Rückstandes geprüft. Sie zeigte schon bei Zimmertemperatur eine reichliche Niederschlagsbildung mit spezifischem Serum. Der leimartig eingetrocknete Niederschlag dieser Alkoholfällung dagegen ergab selbst in konzentrierter wässeriger Lösung mit einem Typhusimmunserum geprüft keine Niederschlagsbildung mehr. Es war also thatsächlich der Gehalt des Alkoholniederschlages an wirksamem Bakterienkoagulin K blofs auf eine mechanische Verunreinigung zu

beziehen, von der der Alkoholniederschlag durch weitere Reinigung völlig befreit werden konnte. Es liefs sich demnach die gesamte Menge der wirksamen Substanz K in alkoholische Lösung bringen.

Das gleiche Verfahren auf den Körper A angewendet, ergab immer das Resultat, dafs in salzhaltiger Lösung die wirksame Substanz mit einem sechs- bis siebenfachen Volumen absoluten Alkohols derart auszufällen war, dafs im alkoholischen Filtrat entweder überhaupt keine oder nur geringe Mengen der wirksamen Substanz nachweisbar blieben und die gesamte an der Niederschlagsbildung beteiligte Substanz im Alkoholniederschlag dauernd zu finden war.

Es geht also aus diesen beiden Versuchsreihen hervor, dafs der in den alten Bouillonkulturen auftretende Körper, und der durch Kochsalzextraktion aus frischen Kulturen gewonnene voneinander durchaus verschieden waren.

Das entgegengesetzte Verhalten beider Körper dem Alkohol gegenüber liefs sich daher auch zur Trennung der beiden voneinander verwenden.

10 ccm eines zwei Monate alten Typhusbouillonfiltrates werden mit der gleichen Menge einer Lösung von K gemischt und die erhaltene Flüssigkeit mit 200 ccm absoluten Alkohols gefällt, der entstandene Niederschlag abgepreſst und in der dem Ausgangsvolumen entsprechenden Wassermenge gelöst. Das Filtrat wird auf dem Wasserbade eingedampft und der Trockenrückstand in Wasser aufgenommen. Sowohl die Lösung des Niederschlages, wie auch die des Filtrates reagieren mit dem Typhusimmunserum unter Niederschlagsbildung; doch ist diese unter der Einwirkung der ersteren Lösung eine viel massigere trotz der ungefähr gleichwertigen Wirkung der Ausgangslösungen. Diese Differenz ist durch wiederholte Reinigung des Alkoholniederschlages zu beheben und darauf zurückzuführen, dafs bei der Bildung eines Niederschlages ein Teil der Substanz K, wie schon oben angeführt wurde, mechanisch mitgerissen wird.

Versuche, die wirksame Substanz K aus alkohollöslichen, feingepulverten Trockenrückständen durch Ätherextraktion zu gewinnen, ergaben kein eindeutiges Resultat; die wirksame Substanz war nach einwöchentlicher Berührung mit Äther in dem Trockenrückstande nicht mehr nachweisbar, das Ätherextrakt dagegen war einer exakten Prüfung infolge störender Anwesenheit von Fettstoffen nicht zugänglich. Eine gleich lang dauernde Extraktion der alkoholfällbaren Substanz A mit Äther lieferte das Resultat, dafs im Rückstande nach wie vor eine Substanz zurückgeblieben war, die mit dem Immunserum zusammengebracht binnen einer halben Stunde bei Zimmertemperatur massige Niederschläge lieferte. Es bot sich also auch hier Gelegenheit, das entgegengesetzte Verhalten der beiden Substanzen zu beobachten.

Wie eingangs erwähnt, gelang es Nicolle, durch Maceration junger Coli- und Typhuskulturen mit Alkohol und Äther den als „agglutinierbare“ Substanz bezeichneten Körper zu gewinnen,

während Winterberg vermeintlich dieselbe „agglutinierbare“ Substanz aus alten Bouillonkulturen unlöslich fand. Dieser Widerspruch beider Autoren dürfte durch vorstehende Versuche dahin gelöst sein, dafs es sich um zwei verschiedene Substanzen gehandelt hat, das aus Bouillonkulturen durch Alkohol fällbare Bakterienkoagulin A und das in Alkohol lösliche, durch Extraktion der jungen Kulturen zu gewinnende Bakterienkoagulin K. Indes kann erst die nach den Angaben von Nicolle durchgeführte Äthermaceration der filtrierten und getrockneten Bakterienleiber und die weitere Untersuchung der so dargestellten Substanz über die Identität derselben mit unserem Körper K Aufschlufs geben.

c) Trennung der Bakterienkoaguline A und K durch elektive Entziehung.

Ehrlich [1]) fand, dafs zwei Immunkörper desselben Serums, von denen der eine zu der einen Blutkörperchenart, der andere zu einer anderen Affinität besitzt, sich dadurch trennen lassen, dafs bei Zusammenbringen des Serums mit einer dieser Blutarten nur der eine Immunkörper dem Serum entzogen wird, während der andere zurückbleibt. Für dieses von Ehrlich und Morgenroth zuerst bei der Trennung der Hämolysine des normalen Ziegenserums angewandte Prinzip der „spezifischen Verankerung“, das später mit Erfolg vielseitige Anwendung fand, gelten im grofsen und ganzen auch die Gesetze einer quantitativen Verteilung. Dieses gleiche Prinzip wurde auch hier in nachfolgender Weise benutzt.

α)

Zu 5 ccm des Typhusimmunserums werden 5 ccm des Bakterienkoagulins A steril zugesetzt und die Mischung 24 Stunden im Brutschrank gehalten. Schon nach kurzem Stehen bildet sich ein massiger, flockiger Niederschlag. Die Flüssigkeit wird nach 24 Stunden zentrifugiert und die klare überstehende Lösung nunmehr durch Zusatz der beiden Körper A und K in nachfolgender Weise geprüft:

	Nach 12stündigem Stehen im Brutschrank
1. 1 ccm des restl. Gemenges des Bakterienkoagulins A u. des Typhusimmunserums + 1 ccm Bakterienkoagulin A	bleibt klar.
2. 1 ccm des restl. Gemenges des Bakterienkoagulins A u. des Typhusimmunserums + 1 ccm Typhusimmunserum	nach kurzer Zeit massiger, flockiger Niederschlag.

	Nach 12stündigem Stehen im Brutschrank
3. 1 ccm des restl. Gemenges des Bakterienkoagulins A u. des Typhusimmunserums + 1 ccm Bakterienkoagulin K	nach ½ Stunde ein massiger, flockiger Niederschlag.
4. 1 ccm des restl. Gemenges des Bakterienkoagulins A u. des Typhusimmunserums + 1 ccm physiologische NaCl-Lösung	bleibt klar.
5. 1 ccm des restl. Gemenges des Bakterienkoagulins A u. des Typhusimmunserums + 1 ccm erhitztes Immunserum . . .	bleibt klar.

β)

In gleicher Weise wird der Versuch mit dem Bakterienkoagulin K vorgenommen. 5 ccm des Typhusimmunserums gemischt mit 5 ccm der Lösung K werden nach 24stündigem Stehen im Brutschrank zentrifugiert, von dem entstandenen Niederschlag die klare Lösung abpipettiert und wiederum, wie früher gegen A, K und Typhusimmunserum geprüft:

1. 1 ccm des restl. Bakterienkoagulins K und des Typhusimmunserums + 1 ccm Bakterienkoagulin K	nach 12stündigem Stehen erst zarter, flockiger Belag.
2. 1 ccm des restl. Bakterienkoagulins K und des Typhusimmunserums + 1 ccm Typhusimmunserum	massiger, rasch auftretender Niederschlag.
3. 1 ccm des restl. Bakterienkoagulins K und des Typhusimmunserums + 1 ccm Bakterienkoagulin A	nach 12 Stunden massiger, flockiger Niederschlag.
4. 1 ccm des restl. Bakterienkoagulins K und des Typhusimmunserums + 1 ccm physiologische NaCl-Lösung	bleibt klar.
5. 1 ccm des restl. Bakterienkoagulins K und des Typhusimmunserums + 1 ccm erhitztes Immunserum	bleibt klar.
6. 1 ccm Bakterienkoagulin A + 1 ccm Bakterienkoagulin K + 1 ccm Immunserum	massiger, flockiger Niederschlag.

In Versuchsreihe α zeigt Versuch 1, dafs nach Ausfällung durch das Bakterienkoagulin A keine Substanz mehr in der zentrifugierten Mischung zu finden ist, welche im stande wäre, mit dem überschüssig der Mischung zugesetzten Körper A nochmals unter Niederschlagsbildung zu reagieren. Der Versuch 2 zeigt, dafs in der Mischung selbst noch ein grofser Überschufs Koagulins vorhanden ist, das denn auch auf Zusatz frischen Immunserums seine

Wirkung wiederum entfalten kann. Es war also die gesamte Substanz des Immunserums, welche ursprünglich im stande war, mit dem Körper A die Bildung einer unlöslichen dritten Substanz zu liefern, durch die erfolgte Niederschlagsbildung verbraucht worden. Ganz anders aber steht es mit dem Körper K, wie aus dem Versuch 3 hervorgeht. Ein Zusatz dieses zu der zentrifugierten Mischung erzeugt sofort eine Trübung, der nach kurzer Zeit eine reichliche Niederschlagsbildung folgt. Es mufs daher der Körper K in der Mischung auf Substanzen des Immunserums reagieren können, auf welche der in derselben enthaltene Körper A nicht einzuwirken vermag.

Die gegenteiligen Verhältnisse zeigt die Versuchsreihe β. Die hier im Überschusse in der Mischung befindliche Substanz K vermag erst auf neuerlichem Immunserumzusatz einen Niederschlag zu erzeugen (Versuch 1 und 2); es ist also auch hier durch die Niederschlagsbildung beinahe der ganze Anteil des für K verfügbaren Serumanteiles zur Niederschlagsbildung benutzt worden, während ein Zusatz des Körpers A lehrt, dafs die gleiche, für K unwirksame Mischung im stande ist, mit A einen massigen Niederschlag zu erzeugen.

Es ergiebt sich also aus den beiden Versuchsreihen, dafs die Körper A und K mit verschiedenen Bestandteilen desselben Immunserums reagieren, und somit auch untereinander in Betreff ihrer wirksamen Gruppen verschieden sein müssen.

Dafs es sich bei den angeführten Versuchen nicht etwa nur um Reste des bei der Niederschlagsbildung zurückgebliebenen Immunkörpers handelte, sondern dafs die Reaktionen streng quantitativ verliefen, soll in den folgenden Versuchen gezeigt werden.

Durch Vorversuche wurde ermittelt, dafs das benutzte Typhusimmunserum sowohl mit dem Körper A als auch mit K in einer Verdünnung von 1 : 8 noch gut reagierte, während eine Verdünnung von 1 : 10 nur schwache und eine solche von 1 : 20 keine Niederschlagsbildung mehr zur Folge hatte. Wurden demnach für den Immunserumzusatz dem Grenzwerte nahestehende Verdünnungen gewählt, so war unter den gegebenen Verhältnissen die Versuchsanordnung so empfindlich als möglich, um zu erkennen, ob die Niederschlagsbildung, die durch das Bakterienkoagulin A bedingt war, auch zu einem Verluste an Serumkoagulin K führt und umgekehrt.

α)

3 ccm des zur Hälfte mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Typhusimmunserums wurden mit 3 ccm der Lösung von A versetzt, zur völligen

Absetzung des Niederschlages 24 Stunden im Brutschrank unter Gummiverschluſs stehen gelassen, dann zentrifugiert und die vom gebildeten Niederschlage abgehobene Lösung des so auf das vierfache verdünnten Serums geprüft:

	Nach vierstündigem Stehen im Brutschrank
1. 1 ccm Lösung + 1 ccm Bakterienkoagulin A	bleibt klar.
2. 1 ccm Lösung + 1 ccm Typhusimmunserum	massiger, flockiger Niederschlag.
3. 1 ccm Lösung + 1 ccm Bakterienkoagulin K	sofortiger dichter Niederschlag.
4. 1 ccm Lösung + 1 ccm physiologische Kochsalzlösung	bleibt klar.
5. 1 ccm Lösung + 1 ccm erhitztes Immunserum	bleibt klar.

Der entgegengesetzte Versuch, in welchem wiederum die Mischung von 3 ccm des halbverdünnten Immunserums mit 3 ccm des Bakterienagglutinins K das Ausgangsmaterial lieferte, ergab folgendes:

β)

	Nach vierstündigem Stehen im Brutschrank
1. 1 ccm Filtrat + 1 ccm Bakterienkoagulin K	bleibt klar.
2. 1 ccm Filtrat + 1 ccm Immunserum	sofortiger Niederschlag.
3. 1 ccm Filtrat + 1 ccm Bakterienkoagulin A	massiger Niederschlag.
4. 1 ccm Filtrat + 1 ccm 0,6 prozent. Kochsalzlösung	bleibt klar.
5. 1 ccm Filtrat + 1 ccm $^1/_2$ Stunde auf 60° erhitztes Immunserum . .	bleibt klar.

In beiden Versuchsreihen vermochte das auf $^1/_8$ verdünnte Immunserum in gleicher Stärke wie eine auf $^1/_8$ verdünnte Vergleichslösung Niederschläge zu erzeugen (Versuche α 3 und β 3). Es war also durch die jeweilige Niederschlagsbildung nichts von dem für den anderen Körper zum Auslösen des Niederschlages nötigen Serumbestandteil verloren gegangen. Die elektive Ausfällung war demnach eine quantitative.

d) Trennung des Typhusbakterienkoagulins K von dem Typhusbakterienagglutinin durch Waschen mit Kochsalz.

α)

Aus der Darstellung eines früheren Versuches geht hervor, daſs der wirksame Körper K den Bakterienleibern durch Extraktion

mit Kochsalz oder destillirtem Wasser entzogen werden kann. Es lag nun die Frage vor, ob die auf solche Weise des wirksamen Körpers beraubten Bakterienleiber sich die Fähigkeit, mit spezifischem Serum unter Agglutination zu reagieren, bewahrt haben. Malvoz[56]) hat bereits angegeben, dafs Typhusbakterien, die lange Zeit mit Wasser gewaschen worden waren, minder gut agglutiniert werden. Nicolle fand dagegen, dafs Colibouillonkulturen verschiedenen Alters, deren Bakterienleiber nach dem Filtrieren durch eine Chamberlandkerze mit dem zehnfachen Volumen destillierten Wassers gewaschen worden waren, je nach ihrem Alter eine verschiedene Agglutinierbarkeit aufweisen. Während junge gewaschene Kulturen ebenso rasch agglutiniert wurden wie nicht gewaschene, liefsen sich die aus alten Kulturen stammenden Bakterienleiber nach dem Waschen nur langsam oder überhaupt nicht agglutinieren. Indes zeigen neuere Untersuchungen, dafs der Salzgehalt bei dem Phänomen der Agglutination eine so grofse Rolle spielt, dafs nicht ausgeschlossen werden kann, ob nicht bei den angeführten Versuchen, in denen Bakterien mit Wasser gewaschen worden waren, der Mangel einer genügenden Salzmenge mit in die Wagschale fällt. So hat Bordet[39]) gezeigt, dafs agglutinierte Bakterien in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt einer raschen „Reagglutination" unterliegen, während die gleichen Bakterien in einer durch destilliertes Wasser bedingten Aufschwemmung endgültig voneinander getrennt bleiben. Es wurde demgemäfs bei dem Trennungsversuche folgendermafsen vorgegangen:

Achttägige Typhusagarkulturen wurden in 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, die Aufschwemmung 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und hierauf in einzelnen Partien zentrifugiert; die von den am Boden des Zentrifugenglases abgeschiedenen Bakterien abgehobene Kochsalzlösung enthielt reichlich den Körper K, wie ja leicht in der durch ein Pukallfilter getriebenen Flüssigkeit zu konstatieren war. Dieselbe wurde nunmehr durch die gleiche Menge frischer physiologischer Kochsalzlösung ersetzt, die Bakterien in dieser Lösung neuerdings aufgeschwemmt und das ganze abermals 24 Stunden stehen gelassen und nachher zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zehnmal hintereinander wiederholt und zwar so lange, bis die von den zentrifugierten Bakterien abgehobene Waschflüssigkeit, nach dem Passieren eines Pukallfilters mit dem Typhusimmunserum versetzt, in einer Probe keine Niederschlagsbildung mehr aufwies.

Dieses Verfahren ist mit empfindlichen Verlusten an Bakterienmaterial verbunden, doch war es für den verfolgten Zweck das allein zugängliche, da eine eventuell in Betracht kommende Reinigung der Bakterien durch

Dialyse schon aus dem Grunde ausgeschlossen war, weil der Körper K, wie oben ausgeführt wurde, die Dialysiermembran überhaupt nicht oder nur spurenweise passiert.

Diese gewaschenen Bakterien nun zeigten, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, auf Zusatz des Typhusimmunserums eine momentane Agglutination. Es ist damit der Beweis erbracht, dafs die Agglutination der Bakterien unabhängig erfolgt von dem in den Kulturen enthaltenen und den Bakterien durch Waschen mit Kochsalzlösung oder Wasser zu entziehenden Körper K. Dieser letztere ist daher nicht identisch mit der agglutinierbaren Substanz der Bakterienleiber.

β) Trennung des Bakterienkoagulins K von dem Typhusbakterienagglutinin mittelst Verdünnung des Immunserums und elektiver Ausfällung.

Bereits früher wurde gezeigt, dafs das Typhusimmunserum für die Bildung des Niederschlages schon bei einer Verdünnung von 1 : 10 seinen Grenzwert erreicht, während die Agglutination der Bakterien noch bei einer Verdünnung von 1 : 20000 stattfindet. Man konnte schon auf Grund dieser so verschiedenen quantitativen Wirkung eine Trennung der Körper A, K und der „agglutinierbaren" Substanz der Bakterienleiber in Aussicht nehmen.

Der Versuch, der den Körper A betrifft, wird später beschrieben. Bezüglich des Körpers K wurde in nachfolgender Weise verfahren:

Junge Typhusagarkulturen wurden in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und ein Teil dieser Aufschwemmung durch ein Pukallfilter getrieben; dieses Filtrat konnte noch bei einer Verdünnung von 1 : 400 mit dem unverdünnten Typhusimmunserum unter Niederschlagsbildung reagieren. Diese Verdünnung also stellte für die in der gegebenen Menge der Typhusaufschwemmung vorhandenen Substanz K den Titer dar. Gleichzeitig wurde ein auf das 30fache verdünntes Immunserum mit der doppelten Menge (6 ccm) der gleichen Typhuskochsalzaufschwemmung versetzt, die Mischung, mit Gummistopfen verschlossen, einige Stunden im Brutschranke stehen gelassen, hierauf zentrifugiert und von dem entstandenen Niederschlage die klare, überstehende Lösung abpipettiert und nunmehr geprüft:

1. 1 ccm Lösung + 1 ccm Typhusimmunserum . . . . . sofortige Trübung und rasche Niederschlagsbildung.
2. 1 ccm Lösung + 1 ccm $^1/_2$ Stunde bei 60° gehaltenes Typhusimmunserum . . bleibt klar.
3. 1 ccm Lösung + 1 ccm Typhuseuglobulin sofortige Trübung und Niederschlag.

4. 1 ccm Lösung + 1 ccm Typhuspseudoglobulin . . . . . bleibt klar.
5. 1 ccm Lösung + 1 ccm Bakterienkoagulin K . . . . . bleibt klar.
6. 1 ccm Lösung + 1 ccm Typhusbouillonkultur . . . . . sofortige Agglutination.

Aus den angeführten Versuchen ist leicht zu ersehen, dass der Körper K nicht mit der Agglutination der Bakterien verloren gegangen, sondern in der zentrifugierten Lösung zurückgeblieben war und hier in der verschiedensten Weise nachgewiesen werden konnte; dafs er aber quantitativ wieder aufzufinden war, konnte dadurch gezeigt werden, dafs nun abermals der Titer des Körpers K in der Lösung festgestellt wurde. Es ergab sich, dafs mit Einschlufs der durch die Versuchsanordnung gesetzten $^1/_2$fachen Verdünnung die Lösung im Verhältnis von 1:450 noch im stande war, mit dem unverdünnten Serum Niederschlag zu erzeugen.

Gelegentlich dieser Versuche wurde auch geprüft, ob die von der Substanz K befreiten Bakterien neuerdings im stande sind, gröfsere Mengen der Lösung K an sich zu reifsen.

Es wurden 2 ccm der von dem Bakterienkoagulin K befreiten Bakterienaufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung mit 2 ccm des Bakterienkoagulins K versetzt, gut verschlossen über Nacht in den Brutschrank eingestellt und am nächsten Tage zu 2 ccm der von dem Sediment abgehobenen Lösung 2 ccm eines Typhusimmunserums zugefügt, 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und hierauf die zentrifugierte Flüssigkeit von dem gebildeten Niederschlage abgehoben. Die Prüfung derselben ergab:

1. 1 ccm Lösung + 1 ccm Typhusimmunserum . . . . . rasches Entstehen eines massigen, grobflockigen Niederschlages.
2. 1 ccm Lösung + 1 ccm Bakterienkoagulin K . . . . . bleibt klar.
3. 1 ccm Lösung + 1 ccm Typhusbouillon Agglutination.

Man ersieht, dafs durch den Zusatz des Typhusimmunserums die Bakterien vollständig niedergeschlagen worden waren, die Substanz K dagegen nur teilweise verbraucht war, da ein grofser Teil derselben durch neuerlichen Serumzusatz wieder zur Niederschlagsbildung zu bringen war (Versuch 1). Versuch 2 beweist, dafs für das Bakterienkoagulin K kein verfügbarer Serumanteil verhanden war, während für die Bakterienagglutination noch Immunserum in hinreichender Menge zurückblieb. Es können also gröfsere Mengen des Körpers K nicht durch eine eventuelle Bindung mit der „agglutinierbaren Bakteriensubstanz“ verloren gegangen sein,

wenn auch erst durch quantitativ ausgeführte Versuche der Nachweis zu erbringen sein wird, ob nicht in geringem Umfange beide Substanzen aufeinander einwirken.

e) Trennung des Bakterienkoagulins A von dem Typhusbakterienagglutinin.

Da der Körper A den Bakterienleibern nicht so leicht entzogen werden kann wie der Körper K, sondern erst durch den Zerfall der Bakterienzellen in Freiheit zu gelangen scheint, so war von vornherein ein inniger Zusammenhang zwischen der „agglutinierbaren" Substanz der Bakterienleiber, wie sie sich in den toten und ausgewaschenen Bakterienzellen noch vorfindet, und dem etwa durch den Zerfall der Bakterien in die Bouillon gelangenden Bakterienkoagulin A möglich. Es konnten aber auch die beiden Körper trotz ihres Zusammenvorkommens innerhalb der Bakterienzellen verschieden sein, und endlich war es auch denkbar, dafs der Körper A nur der Einwirkung der Bakterienzelle auf das umgebende Nährmedium seine Existenz verdankte. Während die Frage nach der Art der Entstehung des Körpers A sowie nach dem gegenseitigen Verhältnis dieser beiden Körper zu einander hier zunächst offen blieb und anderen im Gange befindlichen Versuchen vorbehalten ist, konnte die Frage nach der Identität oder Verschiedenartigkeit der beiden Substanzen in folgender Weise entschieden werden.

α) Trennung mittels Zentrifugierens.

2 ccm einer dichten Kochsalzaufschwemmung von Typhusbakterien, die mit Kochsalzlösung bis zur Entfernung des Körpers K gewaschen worden waren, wurden mit 2 ccm des Bakterienkoagulins A gemischt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und zentrifugiert, wobei die Bakterien ein am Boden festhaftendes Depot bilden. Die überstehende klare Lösung wurde auf die Anwesenheit des Körpers A durch Zusatz von Typhusimmunserum geprüft: 1 ccm der zentrifugierten Mischung giebt mit 1 ccm des Typhusimmunserums rasch einen reichlichen, flockigen Niederschlag; derselbe entsteht in ungefähr gleicher Mächtigkeit wie der in der Kontrollprobe.

β) Trennungsversuch mittels Verdünnung des Immunserums.

In ähnlicher Weise wie bei dem analogen Versuche mit dem Körper K wurde auch hier verfahren, nur dafs es nötig war, zu diesem Zwecke gewaschene Typhusbakterienleiber zu verwenden, um den die ähnlichen Reaktionen eventuell vortäuschenden Körper K zu entfernen.

Ein Gemenge von 2 ccm der mit Kochsalzlösung gewaschenen Typhusbakterien und 2 ccm des Bakterienkoagulins A wurden mehrere Stunden bei Bruttemperatur stehen gelassen. 2 ccm dieser überstehenden, etwas opaleszenten Lösung werden hierauf mit dem gleichen Volumen eines auf das 40fache mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Immunserums versetzt und das Ganze, gut mit Gummistopfen verschlossen, 12 Stunden lang im Brutschrank gehalten. Die von dem reichlich entstandenen Niederschlage nach dieser Zeit abgehobene Flüssigkeit wurde zu folgenden Versuchen benutzt:

	Nach 12stündigem Stehen bei Zimmertemperatur
1. 1 ccm Lösung + 1 ccm frisches Typhusimmunserum	rasch entstehender reichlicher Niederschlag.
2. 1 ccm Lösung + 1 ccm erhitztes Typhusimmunserum	bleibt klar.
3. 1 ccm Lösung + 1 ccm Bakterienkoagulin A	bleibt klar.
4. 1 ccm Lösung + 1 ccm Typhusbouillonkultur	sofortige Agglutination.

Auch hier zeigt sich, dafs der gröfste Teil des Bakterienkoagulins A in der Lösung intakt geblieben war, während die Typhusbakterien einer vollständigen Agglutination unterlagen. Dafs der auf Zusatz frischen Serums entstandene Niederschlag (Versuch 1) thatsächlich nur durch den Körper A hervorgerufen wurde, wird in dem Versuch 2 gezeigt. Wie spätere Versuche lehren sollen, vermag Immunserum, das durch eine halbe Stunde der Temperatur von 56 bis 60° ausgesetzt worden war, mit den Körpern A und K nicht mehr zu reagieren, während Typhusbakterien ungeschwächt durch ein solches Serum in den Zustand der Agglutination versetzt werden konnten. Aus dem Versuch 2 geht also hervor, dafs der im Versuch 1 den Niederschlag bedingende Körper nicht Bakterien, sondern nur die Substanz A sein konnte. Die Versuche 3 und 4 zeigen das entgegengesetzte Verhalten des $^1/_{30}$ verdünnten Immunserums gegenüber Bakterien und dem Bakterienkoagulin A und dienen gleichzeitig als Kontrolle des Versuchsprinzips. Aus beiden Versuchsreihen ist zu entnehmen, dafs das Bakterienkoagulin A neben der „agglutinierbaren" Substanz der Bakterienleiber anzutreffen ist, dafs also, worauf es hier einzig und allein ankam, beide voneinander vollkommen getrennte Komplexe vorstellen müssen. Da in beiden Versuchen die quantitative Verteilung der beiden Körper keine Berücksichtigung fand, so kann durch sie nicht ausgeschlossen bleiben, dafs ein geringer Teil des Bakterienkoagulins A mit der „agglutinierbaren" Bakteriensubstanz

in irgend welche Beziehungen trat. Doch kann durch eine eventuelle Bindung nur zum geringsten Teil das Bakterienkoagulin A an die agglutinierbare Bakteriensubstanz verloren gegangen sein, da sowohl die Versuchsreihe α, als auch β keinen merklichen Unterschied der Niederschlagsbildung gegenüber den Kontrollproben bot.

γ) Trennungsversuch durch elektive Ausfällung.

Eine 18stündige Typhusagarkultur wird in physiologischer Kochsalzlösung möglichst dicht aufgeschwemmt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und hierauf 3 ccm dieser milchig trüben Aufschwemmung mit 3 ccm eines auf das Doppelte mit 0,6prozentiger Kochsalzlösung verdünnten Immunserums versetzt. Die Mischung bleibt 12 Stunden im Brutschrank und wird samt dem entstandenen Niederschlag zentrifugiert. Die klare überstehende Flüssigkeit wird mit der Pipette abgehoben und zu folgenden Versuchen verwendet:

	Nach 8 Stunden im Brutschrank
1. 1 ccm Lösung + 1 ccm Bakterienkoagulin A	massiger Niederschlag.
2. 1 ccm Lösung + 1 ccm Bakterienkoagulin K	bleibt klar.
3. 1 ccm Lösung + 1 ccm Typhusimmunserum	sofortige Trübung mit rascher Niederschlagsbildung.
4. 1 ccm Lösung + 1 ccm Typhusbouillonkultur	sofortige Agglutination.
5. 1 ccm Lösung + 1 ccm 0.6prozentige Kochsalzlösung	bleibt klar.

Diese in der Verdünnungsgrenze des Immunserums für die Bakterienkoaguline A und K angestellten Versuche sind in zweifacher Hinsicht bemerkenswert. Der Versuch 1 zeigt, dafs das Bakterienkoagulin A durch die vorher stattgefundene Agglutination der dichten Bakterienaufschwemmung mit dem Immunserum nichts an der Fähigkeit eingebüfst hatte, mit demselben Serum unter starker Niederschlagsbildung zu reagieren, dafs also die Reaktion der Bakterienaufschwemmung in ganz anderem Sinne verlaufen mufs als die des Körpers A auf ein und dasselbe Immunserum. Aus dem Versuch 2 dagegen geht hervor, dafs mit der Agglutination der Typhusbakterien das Immunserum gleichzeitig die Fähigkeit verloren hat, mit dem Bakterienkoagulin K zu reagieren; dieses Versuchsresultat findet seine selbstverständliche Erklärung darin, dafs in der Kochsalzbakterienaufschwemmung nicht allein die „agglutinierbare“ Substanz der Bakterienleiber vorhanden war, sondern auch das Bakterienkoagulin K in so grofser Menge in die

Kochsalzlösung übergegangen war, dafs dessen Substanz in so bedeutendem Überschusse die „agglutinierbare“ Bakteriensubstanz übertraf, dafs nicht einmal der Immunserumzusatz ausreichte, um mit dem so reichlich dargebotenen Bakterienkoagulin K zu reagieren. Erst ein neuerlicher Zusatz (Versuch 3) von Immunserum ist im stande, eine Niederschlagsbildung zu erzielen. Endlich zeigt der Versuch 4, dafs das gleiche Serum noch immer die Fähigkeit besitzt, Typhusbakterien zu agglutinieren; natürlich kann, wie dies schon Gruber festgestellt hat, diese Fähigkeit nur einen Bruchteil der ursprünglichen agglutinierenden Kraft bilden, entsprechend der seither von vielen Seiten bestätigten Thatsache, dafs die „Agglutinine“ während der Reaktion verbraucht werden. Im Gegensatze hierzu ist die Fähigkeit des gleichen Serums, mit dem Bakterienkoagulin A zu reagieren, ungeschwächt, wie dies durch den Umstand dargethan wird, dafs eine dem Grenzwerte entsprechende Verdünnung eine prompte Reaktion zur Folge hat.

2. Untersuchungen über die an der Agglutination und Niederschlagsbildung beteiligten Körper des Typhus- und Choleraimmunserums.

Bereits im ersten Teile dieser Versuche wurde gezeigt, dafs die die Typhusbakterien und Cholerabakterien agglutinierende Substanz des Serums der verschiedenen Tierarten in ihrem Aussalzungsvermögen ein gutes Charakteristikum darbietet. Da durch die vorhergehenden Untersuchungen der Nachweis erbracht worden ist, dafs an der Niederschlagsbildung und an der Bakterienagglutination verschiedene Substanzen der Typhuskulturen beteiligt sind, so war zunächst zu untersuchen, wie schon vorher angedeutet worden ist, ob diese Verschiedenheit auch im Serum der mit Typhuskulturen immunisierten Tiere in der Bildung verschiedenartiger Immunkörper seinen Ausdruck findet. Es wurde dabei derart vorgegangen, dafs die einzelnen Eiweifskörper der Immunsera, deren Trennung in der ersten Mitteilung beschrieben worden ist, auf ihre physiologische Wirksamkeit hin gegenüber den isolierten Produkten der Bakterienkulturen geprüft wurden. Bezüglich der Agglutination der Bakterienleiber wurde bereits im ersten Teile festgestellt, dafs die wirksame Substanz im Typhusimmunpferdeserum den Fällungsgrenzen nach dem Pseudoglobulin entspricht, im Choleraimmunpferdeserum dagegen die des Euglobulins aufweist; während bezüglich dieser Befunde auf diese Versuche

hier hingewiesen sein möge, führe ich die Versuche, welche sich auf die Isolierung der wirksamen Serumkomponenten bei der Niederschlagsbildung mit den Substanzen A und K der Typhuskulturen beziehen, hier an.

A. Typhusimmunpferdeserum.

a) Trennung der Serumkoaguline A und K von dem Serumagglutinin durch Salzfällung.

Aus 150 ccm frischen Typhusimmunpferdeserums wurden durch Fällung mit gesättigter Ammonsulfatlösung die drei im Pferdeglobulin vorhandenen Eiweifskörper isoliert und durch wiederholtes Lösen und Fällen entsprechend den bestimmten Fällungsgrenzen gereinigt. Die Niederschläge wurden endlich entsprechend dem Volumen der Ausgangsmenge des Serums in Wasser gelöst*), so dafs die Konzentrationsverhältnisse der Eiweifskörper dieselben blieben wie im Serum: α) Fibrinoglobulin, β) Euglobulin, γ) Pseudoglobulin. Alle drei Globuline wurden mit den beiden Bakterienkoagulinen A und K geprüft:

α) Fibrinoglobulin:

	Nach 12stündigem Stehen im Brutschrank
1. 1 ccm Fibrinoglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin A	bleibt klar.
2. 1 ccm Fibrinoglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin K	bleibt klar.
3. 1 ccm Fibrinoglobulin + 1 ccm Kochsalzlösung	bleibt klar.

β) Euglobulin:

4. 1 ccm Euglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin A	nach kurzer Zeit flockige Fällung.
5. 1 ccm Euglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin K	sofortige Trübung und rasche Fällung.
6. 1 ccm Euglobulin + 1 ccm Kochsalzlösung	bleibt klar.

γ) Pseudoglobulin:

7. 1 ccm Pseudoglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin A	bleibt klar.
8. 1 ccm Pseudoglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin K	bleibt zunächst klar, nach mehreren Stunden leichter, flockiger Niederschlag.
9. 1 ccm Pseudoglobulin + 1 ccm Kochsalzlösung	bleibt klar.

*) Die Lösungen wurden durch Toluolzusatz vor Zersetzung geschützt.

Aus dieser Versuchsreihe ergiebt sich, dafs das Euglobulin allein Substanzen enthält, welche im stande sind, mit den Bakterienkoagulinen A und K spezifische Niederschläge zu bilden. Weder das Fibrinoglobulin, noch das Pseudoglobulin vermögen in ähnlicher Weise zu reagieren.

Die in Versuch γ noch nach mehrstündigem Stehen der Pseudoglobulinlösung mit dem Bakterienkoagulin K eingetretene geringe Reaktion verdankt ihr Entstehen Verunreinigungen, welche zurückbleiben, wenn das Euglobulin entsprechend den oben angeführten Fällungsgrenzen mit Ammonsulfatlösung versetzt wurde. Die genaue Bestimmung der Fällungsgrenzen für den Immunkörper K ergiebt denn auch, dafs dessen obere Ausfällungsgrenze zwischen 3,4 und 3,6 ccm : 6,6 resp. 6,4 ccm der Lösung, also etwas höher als der sonst durch die Ausfällung des Euglobulins benutzten Sättigungsgrenze entspricht. Erfolgt die Darstellung des Euglobulins entsprechend der etwas höheren Fällungsgrenze von 3,4 bis 3,6 ccm Salz : 6,6 bis 6,4 ccm Gesamtlösung, so verschwindet regelmäfsig auch der letzte Rest dieses Immunkörpers aus dem Pseudoglobulin. Aber gerade diese Beobachtung lehrt schon, dafs der mit der Substanz A und K reagierende Immunkörper nicht identisch sein kann, da der für A mafsgebende Serumanteil stets schon bei der niedrigeren Fällungsgrenze von 3,3 : 6,7 ccm vollkommen ausgesalzen werden kann. Diese Erscheinung steht im Einklange mit den bereits im vorigen Kapitel angeführten Versuchen der elektiven Ausfällung des Immunserums durch die beiden Bakterienkoaguline A und K, die auch eine Verschiedenheit der reagierenden Serumanteile beweist. Der Kürze wegen bezeichne ich die beiden Körper als Typhusserumkoagulin A und als Typhusserumkoagulin K. Da beide Substanzen die Fällungsgrenzen des Euglobulins aufweisen und dennoch voneinander verschieden sind, so folgt daraus, dafs weder der eine noch der andere Körper mit dem als Euglobulin bezeichneten Eiweifskörper zu identifizieren sein wird. Da das Typhusagglutinin des Pferdeserums ausschliefslich die Fällungsgrenzen des Pseudoglobulins aufweist und auch mit diesem allein auszufällen ist, so geht weiter aus den obigen Versuchen hervor, dafs Serumkoagulin A und K vollständig zu scheiden sind von dem Typhusagglutinin des Pferdeserums. Wir haben sonach im Typhusimmunpferdeserum mindestens drei Immunsubstanzen zu unterscheiden: a) Typhuskoagulin A, b) Typhuskoagulin K und c) das Typhusagglutinin. Gleichzeitig erklärt die Anwesenheit der beiden Typhuskoaguline in der

Euglobulinfraktion, weshalb diese von den letzten Resten des Typhusagglutinins so schwer zu reinigen ist; denn da nicht allein die dem Euglobulin eventuell mechanisch anhaftenden Pseudoglobulinpartieen eine Agglutination bewirken, sondern auch durch die im Euglobulin enthaltenen Koaguline eine indirekte Ausfällung der Bakterien statthaben kann, so sind selbst durch eine wiederholte Reinigung des Euglobulins die ihm anscheinend anhaftenden agglutinierenden Eigenschaften nicht zu beseitigen.

Da durch Fuld und Spiro[24]) gezeigt worden ist, dafs das Euglobulin und Pseudoglobulin entgegengesetzte physiologische Wirkungen auszuüben vermögen, so dafs unter Umständen beide Körper einander in ihren Wirkungen aufheben, so war es noch nötig, auch hier die beiden Serumfraktionen in ihrer Einwirkung

	Euglobulin ccm	Pseudoglobulin ccm	1proz. Kochsalzlösung ccm	Bakteriokoagulin A ccm	Nach 4 Stdn. Brutschranktemperatur
1.	1	0,2	0,8	1,0	Niederschlagsbildung.
2.	1	0,4	0,6	1,0	„
3.	1	0,6	0,4	1,0	„
4.	1	0,8	0,2	1,0	„
5.	1	1,0	—	1,0	„
6.	0,8	1,0	0,2	1,0	„
7.	0,6	1,0	0,4	1,0	Unvollständ. Niederschlagsbildung erst nach 24 Stdn. vollständig.
8.	0,4	1,0	0,6	1,0	Der gleiche Befund.
9.	0,2	1,0	0,8	1,0	Kein Niederschlag, erst nach 24 Stunden zarte Flocken.
10.	—	1,0	1,0	1,0	Bleibt klar.
11.	1,0	—	1,0	1,0	Niederschlag.
12.	0,5	1,5	—	1,0	Niederschlagsbildung.
13.	0,2	—	1,8	1,0	Erst nach 24 Stunden leichter, flockiger Niederschlag.
14.	0,2	—	2,0	1,0	Bleibt klar.
15.	0,5 Euglobulin aus Diphtherieantitoxin	0,5 Typhus-Pseudoglobulin	—	1,0	„ „
16.	0,2 Typhuseuglobulin	1,0 Pseudoglobulin aus Diphtherieantitoxin	1,0	1,0	„ „
17.	1,0 Choleraserum	—	—	1,0	„ „

aufeinander zu prüfen, zumal die Anologie der Niederschlagsbildung mit den Prozessen der Labgerinnung, bezüglich deren jene Untersuchungen stattfanden, augenfällig schien. Es wurde demnach bezüglich des Bakterienkoagulins A folgende Versuchsreihe aufgestellt (siehe vorstehende Tabelle a. S. 415):

Man ersieht aus dieser Versuchsreihe, dafs die Niederschlagsbildung nur von dem Euglobulin abhängig ist. Weder Euglobulin, noch Pseudoglobulin aus einem anderen Immunserum dargestellt, vermögen einen Niederschlag hervorzurufen. Bezüglich des Bakterienkoagulins K konnte ich mich gelegentlich überzeugen, dafs auch für dieses das Pseudoglobulin keine hemmende Wirkung ausübt.

b) Trennung der Serumkoaguline von dem Serumagglutinin durch Dialyse.

Da das Euglobulin mit dem durch Dialyse ausfällbaren in salzfreier Flüssigkeit also zum gröfsten Teil unlöslichen Globulin von Marcus identisch ist, so mufste es auch gelingen, zwischen den beiden dem Euglobulin angehörenden Koagulinen und dem in salzfreiem Wasser in Lösung bleibenden Pseudoglobulin resp. Typhuspferdeagglutinin durch Dialyse eine Trennung herbeizuführen. Typhusimmunserum wurde unter Toluol zehn Tage lang durch eine Pergamentmembran gegen destilliertes Wasser dialysiert. Innerhalb dieser Zeit hatte sich am Boden des Dialysiergefäfses der im Wasser unlösliche Teil des Globulins ausgeschieden. Der in Lösung gebliebene Anteil wird von dem ungelöst gebliebenen abfiltriert und auf seine Wirksamkeit gegen das Bakterienkoagulin A und K geprüft, sowie gegen eine Kochsalzaufschwemmung einer 12stündigen Typhusagarkultur.

	Nach 12stünd. Stehen im Brutschrank
1. 1 ccm dialysiertes Typhusimmunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin A + einige Tropfen physiolog. Kochsalzlösung . .	bleibt klar; dieselbe mit nichtdialysiertem Immunserum versetzte] Probe zeigt sofortige Trübung und rasche Niederschlagsbildung.
2. 1 ccm dialysiertes Typhusimmunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin K + einige Tropfen physiolog. Kochsalzlösung . .	bleibt zunächst klar; nach einstündigem Stehen Auftreten leichter Opaleszenz; die Kontrollprobe zeigt sofortige Trübung u. rasche Fällung.

Der nach der Dialyse zurückgebliebene unlösliche Globulinniederschlag wurde abgepreſst und in 1 prozentiger Kochsalzlösung entsprechend dem Ausgangsvolumen gelöst und wiederum geprüft:

	Nach 4stünd. Stehen im Brutschrank
3. 1 ccm Kochsalzlösung des Niederschlages + 1 ccm Bakterienkoagulin A	sofortige Trübung, später Niederschlag.
4. 1 ccm der Kochsalzlösung des Niederschlages + 1 ccm Bakterienkoagulin K	sofortige Trübung und rasche Fällung.

Sowohl das Koagulin A, als auch das Koagulin K waren also durch Dialyse auszufällen; auch hier tritt abermals der Unterschied zwischen den beiden Körpern deutlich hervor; das Koagulin A war aus der dialysierten Lösung vollkommen verschwunden, während von dem Typhuskoagulin K noch immer Reste, wenn auch spurenweise, in der dialysierten Flüssigkeit nachzuweisen waren, ein Umstand, der zu der unvollständigen Entfernung des Euglobulins durch die Dialyse eine Parallele bildet. Ganz anders verhielt sich das Typhusagglutinin. Es war zum gröfsten Teile in der dialysierten Lösung zurückgeblieben und nur zum geringsten Teile in dem Niederschlage nachweisbar, wie dies in gleicher Weise bereits durch Winterberg gefunden worden ist.

c) Verhalten der Serumkoaguline sowie des Typhusagglutinins gegen Erhitzen und Zersetzung.

Wird frisches Typhusimmunserum, das beide Koaguline und Typhusagglutinin enthält, durch $^1/_2$ bis $^3/_4$ Stunden auf dem Wasserbade einer Temperatur zwischen 58° bis 60° ausgesetzt, so zeigt sich, dafs dasselbe seine Eigenschaft, mit dem Bakterienkoagulin K und A Niederschläge zu erzeugen, vollkommen eingebüfst hat, während die Fähigkeit der Agglutination der Typhusbakterien ungeschwächt erhalten bleibt. Diese Beobachtung kann ausnahmslos gemacht werden und gilt selbstverständlich auch für die mit dem Euglobulin ausgefällten Körper. Es zeigt sich zuweilen, dafs Sera, insbesondere solche, die rasch nach dem Aderlafs in dieser Weise behandelt wurden, bei längerem Stehen im Brutschrank mit den betreffenden Lösungen einen geringen Bodensatz abscheiden; dieser hat indes nichts mit der hier gemeinten Reaktion zu thun. Es gelingt also auch auf diese Weise, eine Trennung der beiden Koaguline von dem Typhusagglutinin durchzuführen und die beiden Körpergruppen als wesentlich voneinander verschieden zu charakterisieren.

Ein ganz merkwürdiges Verhalten bietet dabei häufig aber das Typhusagglutinin. Während die beiden Koaguline durch die Erwärmung auf 60° ihre Wirksamkeit total einbüfsen, wird durch die gleiche Prozedur dasselbe Serum in seiner Agglutinationsfähigkeit bedeutend erhöht. So z. B. vermochte ein Typhusimmunserum, dessen Agglutinationsgrenze zwischen den Verdünnungen von 1:10000 bis 1:20000 lag, nach dem Erhitzen durch drei viertel Stunden auf 60° in der doppelten Verdünnung, also 1:40000, die gleiche Typhusagaraufschwemmung innerhalb einer halben Stunde vollkommen zu agglutinieren; die Verdünnungsgrenze, die hier nicht weiter festgesetzt wurde, lag also noch viel höher. Dieser Befund kann insbesondere bei Seren erhoben werden, die längere Zeit bei Zimmertemperatur, sei es steril oder ohne besondere Vorsichtsmafsregel gegen Zersetzung, aufbewahrt worden waren.

Es ist nicht gelungen, für das Auftreten dieser Erscheinung, die in gleicher Weise an dem erhitzten Pseudoglobulin beobachtet werden kann, einen sicheren Grund ausfindig zu machen. Es liegt natürlich am nächsten, hier an die Zerstörung einer Substanz, eines „Lysins" oder an die Lösung einer Verbindung zu denken, die im nichterhitzten Serum einen Teil der agglutinierenden Wirkung aufzuheben im stande wäre. Die Existenz einer solchen „agglutinationswidrigen" Substanz auf direktem Wege, insbesondere im Serum normaler Tiere nachzuweisen und die Umstände ihrer Wirkung zu studieren, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Dafs indes nicht allein die Erwärmung, sondern auch andere Vorgänge, die erfahrungsgemäfs mit Zerstörung der Wirksamkeit gewisser fermentähnlicher Substanzen einhergehen, wie die Zersetzung, Ähnliches herbeiführen können, zeigt nachfolgender Versuch, der mit einem aus Typhusimmunserum isolierten leicht ammonsulfathaltigen Pseudoglobulinpräparat angestellt worden war.

Dasselbe war durch zwei Monate bei Zimmertemperatur ohne Toluolzusatz gehalten worden, trübte sich während dieser Zeit und liefs einen erheblichen Bodensatz ausfallen. Diese Lösung wurde klar filtriert und ihr Agglutinationsvermögen bestimmt. Die Lösung agglutinierte vollständig bei einer Verdünnung von 1:4000, in einer Verdünnung 1:6000, 1:8000 und 1:10000 war nach sechsstündigem Stehen im Brutschrank nur mehr eine unvollständige Agglutination zu beobachten, die bei einer Verdünnung von 1:15000 vollkommen ausblieb.

2 ccm dieser Lösung wurden behufs Anstellung anderer Versuche mit 2 ccm des Bakterienkoagulins A versetzt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen; hierauf wurde das Gemisch mit der gleichen Typhusaufschwemmung in der üblichen Weise geprüft: während die bereits angeführte Kon-

trollprobe eine vollständige Agglutination nur bei einer Verdünnung von 1:4000 aufwies, zeigte die Mischung in der gleichen Zeit (nach sechs Stunden) in einer Verdünnung von 1:40000 (bezogen auf die gesetzte Verdünnung der Ausgangslösung) eine prompte Agglutination. In welcher Weise hier die gegenseitige Beeinflussung des Bakterienkoagulins A und des Typhusagglutinins verlaufen ist, muſs vorläufig offen gelassen werden.

In solchen Serumarten läſst sich aber gleichzeitig nach dem Erhitzen noch ein anderes eigentümliches Verhalten beobachten, das der Erhöhung der Agglutinationswirkung entgegenwirkt, nämlich das völlige Fehlen desselben bei geringen Verdünnungen, während Proben mit höherer Verdünnung ausgesprochene Agglutination aufweisen.

Eine solche Versuchsreihe, angestellt mit einem Serum, das mehrere Wochen bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden war und hierauf drei viertel Stunden im Wasserbade auf 60° erhitzt wurde, möge hier wiedergegeben sein. Die Prüfung fand statt gegen eine dichte Kochsalzaufschwemmung einer achtstündigen Typhusagarkultur; Prüfung nach vierstündiger Bruttemperatur:

Verdünnung	1:20	1:200	1:2000	1:4000	1:6000	1:8000
Ergebnis der Prüfung	Keine Aggl.	Keine Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.	Aggl.

Verdünnung	1:10000	1:20000	1:40000
Ergebnis der Prüfung	Aggl.	Agl.	Aggl.

Alle Proben bleiben auch nach 24 stündigem Stehen unverändert.

In dieser augenfälligen Form konnte jedoch diese Beobachtung nur vereinzelt gemacht werden. Öfters gelang es nur eine bedeutende Verzögerung der Agglutination gegenüber jenen Proben, die mit gröſseren Verdünnungen angestellt worden waren, zu beobachten; insbesondere war dies dann recht deutlich zu sehen, wenn die Beobachtung der einzelnen Proben nicht bei Bruttemperatur, sondern bei Zimmertemperatur angestellt worden war und die einzelnen Phasen der Agglutination langsamer verliefen. Ob dieses Phänomen mit dem Freiwerden eines neuen Körpers zusammenhängt, der, in geringer Menge vorhanden, nur in den konzentrierten Serumproben seine agglutinationshemmende Wirkung entfalten kann, oder mit dem Auftreten des noch näher anzuführenden koagulinhemmenden Körpers, oder ob es in anderen Verhältnissen eine Erklärung findet, können erst weitere Erfahrungen lehren.

Das Verhalten der drei Körper gegenüber Fäulnis und Zersetzungsvorgängen war ein verschiedenes. Während das Typhusagglutinin im Pseudoglobulinniederschlag durch Fäulnis nicht im

geringsten beeinflufst wurde, zeigten die beiden Koaguline sich nicht allein gegenüber Zersetzungsvorgängen jeder Art ungemein empfindlich, sondern bereits längeres Stehen bei Zimmertemperatur unter sorgfältiger Beobachtung aller Kautelen gegen bakterielle Verunreinigung, selbst unter Toluolzusatz, vernichtete nach zwei bis drei Wochen die beiden Koaguline entweder vollständig oder schwächte sie bedeutend in ihrer Wirkung. Eigentümlicherweise trat diese Labilität der Koaguline nur dann zu Tage, wenn sie aus dem Immunserum mit der Euglobulinfraktion durch Aussalzen gereinigt worden waren, während Immunserum, selbst wenn es monatelang bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden war, sei es unter Toluolzusatz oder ohne solchen, immer wieder beim Aussalzen des Euglobulins physiologisch gut wirksame Präparate lieferte, die jedoch dann wieder die eben erwähnte leichte Zersetzlichkeit, die sie von dem Typhusagglutinin unterscheidet, aufwiesen.

d) Trennung der Serumkoaguline A und K von dem Serumagglutinin durch elektive Ausfällung.

Bereits in einem früheren Versuche wurde durch elektive Ausfällung eine Trennung der Bakterienkoaguline A und K erzielt und gleichzeitig auch die Verschiedenheit der beiden daran beteiligten Serumbestandteile, der Koaguline A und K, dargethan. Es handelte sich nun vor allem darum, auf die gleiche Weise die beiden Koaguline von dem Typhusagglutinin desselben Serums zu trennen. Dies konnte auf zweifache Art erreicht werden. Einmal dadurch, dafs dem Typhusimmunserum durch Eintragen von gewaschenen (von dem Bakterienkoagulin K gereinigten) Typhusbakterien seine agglutinierenden Fähigkeiten entzogen wurden, wobei die Koaguline A und K in unverminderter Stärke wirksam bleiben mufsten; zweitens in umgekehrter Weise, indem nach Verbrauch der Serumkoaguline A und K durch die Bakterienkoaguline A und K der Nachweis erbracht wurde, dafs das Typhusagglutinin noch in unverminderter Stärke die Typhusbakterien zu agglutinieren im stande sei.

Die erste Art der Versuchsanordnung führte trotz wiederholter Versuche zu keinem eindeutigen Resultate; viele Versuche scheiterten an der Schwierigkeit, in dem hochwirksamen Serum das gesamte Agglutinin durch Massenkulturen zu binden, ohne dafs anderseits die dadurch bedingte Volumzunahme und Verdünnung des Serums jenen Grenzwert erreicht hätte, an welchem die Wirk-

samkeit der Koaguline ebenfalls ihr Ende findet; war dies endlich auch scheinbar gelungen, so war das Ausfallen der Niederschläge auf Zusatz der Bakterienkoaguline A und K ein so langsames, dafs das Versuchsresultat ein unsicheres blieb.

Bessere Resultate dagegen ergab die zweite Versuchsanordnung: Typhusimmunserum von dem Agglutinationswert 1:20000 wurde mit den Bakterienkoagulinen A und K oder der Mischung der beiden letzteren versetzt, die Flüssigkeit bis zum Eintritt des gut abgesetzten Niederschlages im Brutschrank behalten und die vom Niederschlage abgehobene, zentrifugierte Lösung auf ihren Gehalt an Serumkoagulin A, K und an Typhusagglutinin bestimmt. Statt des Bakterienkoagulins A wurde auch alte filtrierte Typhusbouillon angewandt; die Versuchsresultate waren in beiden Fällen identisch:

α) 5 ccm Typhusimmunserum versetzt mit 5 ccm des Bakterienkoagulins A.

Es entsteht rasch ein reichlicher Niederschlag. Die Lösung wird noch wohl verschlossen 12 Stunden bei Bruttemperatur gehalten, zentrifugiert und die abpipettierte, klare Lösung geprüft:

1. 1 ccm Lösung + 1 ccm Typhusimmunserum . . . . . massiger, flockiger Niederschlag.
2. 1 ccm Lösung + 1 ccm Bakterienkoagulin A . . . . . die Lösung giebt selbst nach 24 stündigem Stehen keinen Niederschlag.
3. 1 ccm Lösung + 1 ccm Bakterienkoagulin K . . . . . rascher Niederschlag.
4. Das Agglutinationsvermögen der gleichen Lösung nach vierstündigem Stehen im Brutschrank gegen eine 12stündige Typhusagarkultur (Kochsalzaufschwemmung) ergiebt eine vollständige Agglutination bei einer Verdünnung von 1:10000, eine unvollständige bei 1:20000.

β) 5 ccm desselben Typhusimmunserums versetzt mit dem Bakterienkoagulin K

werden 24 Stunden im Brutschrank belassen. Die vom entstandenen Niederschlag abgehobene klare Lösung ergiebt:

1. 1 ccm Lösung + 1 ccm Typhusimmunserum . . . . . massiger, rasch auftretender Niederschlag.
2. 1 ccm Lösung + 1 ccm Bakterienkoagulin K . . . . . bleibt klar.

3. 1 ccm Lösung + 1 ccm Bakterienkoagulin A . . . . . nach vier Stunden im Brutschrank massiger, flockiger Niederschlag.
4. Der Agglutiningehalt der Lösung beträgt: Verdünnung 1:10000 vollständige Agglutination; 1:20000 unvollständige Agglutination.

γ) Eine Mischung von 2 ccm Bakterienkoagulin A und 2 ccm des Bakterienkoagulins K mit 4 ccm des Typhusimmunserums.

Die Probe wird 24 Stunden im Brutschrank gehalten und die klare Flüssigkeit vom entstandenen Niederschlag abgehoben:

Nach 12 stündigem Stehen

1. 1 ccm Lösung + 1 ccm Typhusimmunserum . . . . . bleibt klar.
2. 1 ccm Lösung + 1 ccm Bakterienkoagulin A . . . . . spärlicher Niederschlag.
3. 1 ccm Lösung + 1 ccm Bakterienkoagulin K . . . . . spärlicher Niederschlag.
4. Die Lösung, geprüft gegen eine 18stündige Typhusagarkultur (Kochsalzaufschwemmung), ist im stande, bei einer Verdünnung von 1:40000 vollständige Agglutination der Typhusbakterien herbeizuführen.

Überblickt man diese drei Versuchsreihen, so ergiebt sich, dafs trotz der zum Teil massigen Niederschlagsbildung überall der Agglutiningehalt der überstehenden Flüssigkeit vollständig oder nahezu vollständig erhalten blieb. Die beiden ersten Versuchsreihen zeigen zunächst, dafs in der Lösung alle Affinitäten des Typhuskoagulins A resp. K gebunden waren; denn ein überschüssiger Zusatz von A oder K vermochte weder in dem Versuche α, noch in dem Versuche β eine Niederschlagsbildung herbeizuführen. Wohl aber mufsten, wie schon früher gezeigt worden ist, die beiden anderen Koaguline intakt bleiben (im Versuch α 3 das Koagulin K, im Versuch β 3 das Koagulin A). In dem Versuch γ war ein Überschufs von Typhusimmunserum verwendet worden, so dafs es im stande war, die gesamte sonst überschüssige Substanz A und K zur Niederschlagsbildung heranzuziehen, wobei es allerdings beinahe völlig an Serumkoagulin A und K erschöpft wurde, wie der in den Versuchen 2 und 3 erst nach 12 Stunden auftretende, spärliche Niederschlag beweist. Dennoch war in allen Fällen das Agglutinin in seiner vollen Stärke, ja im letzten Falle, wo beide Substanzen gemeinsam einwirkten, besonders kräftig zur Wirkung gekommen. Auch Bail[57]), dessen

interessante Arbeit nach Fertigstellung dieser Versuche erschienen war, führt einen dem Versuch α ähnlichen an, ohne jedoch auf quantitative Verhältnisse Rücksicht zu nehmen, während Radzievsky[77]) bei einem analogen Versuch mit Colibouillon eine quantitative Ausbeute der Agglutinine zu finden vermochte.

Zuweilen kann es bei Anstellung dieser Versuche geschehen, dafs die Ausbeute an agglutinierender Substanz keine quantitative ist, sondern Differenzen auftreten, so dafs der Agglutiningehalt der überstehenden Flüssigkeit, wie hier und da in unseren Fällen, bis zu dem Titer von 1:4000 bis 1:6000 hinabsinkt (ähnliche Beobachtungen wurden im Institute auch von Dr. Kraus gemacht), Verluste, die nicht ganz aus Versuchsfehlern zu erklären sind. Diese Verluste seien nur deshalb hier erwähnt, weil sie bei oberflächlicher Beobachtung leicht zu Trugschlüssen Anlafs geben könnten und an ähnliche Beobachtungen erinnern, die schon von mehreren Autoren unter analogen Verhältnissen gemacht worden sind. So hatte Franz Müller[58]) in Gottliebs Institute gefunden, dafs die blutkörperchenagglutinierende und die toxische Substanz des Rizins ein verschiedenes chemisches Verhalten darbieten. Wurden jedoch rote Blutkörperchen durch das Rizin agglutiniert, so nahm die Giftigkeit des Filtrates bedeutend ab. Den gleichen Befund, anscheinend vollkommen unabhängig von Müller und ohne Kenntnis jener Angaben, hat in neuester Zeit Durham[59]) bezüglich des Abrins gemacht; auch er konnte, ohne sich seine Befunde erklären zu können, eine grofse Abnahme der Giftwirkung des Filtrates für Mäuse beobachten. Endlich führt auch Tschistovitsch[60]) in seiner Arbeit über Aalserum an, dafs bei der Bildung der Niederschläge des antitoxischen Kaninchenserums mit dem Aalserum, obwohl die Formation der Präzipitate von der Neutralisation des Toxins durch das Antitoxin wohl unterschieden werden müfste, Toxin mechanisch mitgerissen werden kann, wie etwa phosphorsaurer Kalk Tetanus- oder Diphtherietoxin mit sich reifst. Eine zutreffendere Erklärung dieser merkwürdigen Thatsachen bietet die eben erschienene Arbeit Jacobys[61]) über Rizinimmunität durch den auf genaue quantitative Auswertung gestützten Nachweis einer gemeinsamen haptophoren Gruppe neben getrennten toxophoren und agglutinophoren im Rizinkomplex. Dafs jedoch unsere Verluste nicht in gleicher Weise zu erklären sind, ergiebt sich neben der scharfen Trennung der einelnen Körper schon aus den ungemein differenten quantitativen Verhältnissen zwischen Agglutininen und Koagulinen.

B. Typhusimmunziegenserum.

Entsprechend den früher gefundenen Fällungsgrenzen wurde aus einem Ziegenserum, das nahe bei einer Verdünnung von 1:4000 Typhusbakterien zu agglutinieren im stande war, durch Ammonsulfatfällung Euglobulin und Pseudoglobulin dargestellt und beide in Bezug auf ihre Wirkung gegenüber den Bakterienkoagulinen A und K sowohl im frischen, wie auch im erhitzten Zustande geprüft.

α) Verhalten des frischen Euglobulins und Pseudoglobulins.

Nach achtstündigem Stehen bei 37°

1. 1 ccm Euglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin A . . . . . flockiger Niederschlag.
2. 1 ccm Euglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin K . . . . . flockiger Niederschlag.
3. 1 ccm Euglobulin + 1 ccm 1 prozentige Kochsalzlösung . . . . . bleibt klar.

Nach 24 stündigem Stehen bei 37°

4. 1 ccm Pseudoglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin A . . . . . bleibt klar.
5. 1 ccm Pseudoglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin K . . . . . bleibt klar.

β) Verhalten des durch drei viertel Stunden im Wasserbade auf 60 Grad erhitzten Serums.

Nach 24 stündigem Stehen bei 37°

1. 1 ccm frisches Ziegenimmunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin A . . . flockiger Niederschlag.
2. 1 ccm erhitztes Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin A . . . . . bleibt klar.
3. 1 ccm frisches Ziegenimmunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin K . . . flockiger Niederschlag.
4. 1 ccm erhitztes Ziegenimmunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin K . . . bleibt klar.
5. 1 ccm des erhitzen Immunserums, geprüft gegenüber einer Kochsalzaufschwemmung einer 12 stündigen Typhusagarkultur, ergiebt:

Verdünnung des Serums . .	1:20	1:200	1:400	1:600	1:1000
Agglutination	überall vollständige Agglutination nach 6 stündigem Stehen bei 37°.				

Verdünnung des Serums . .	1:1400	1:2000	1:3000	1:4000
Agglutination	überall vollständige Agglutination nach 6 stündigem Stehen bei 37°.			

Aus den Untersuchungen, die im ersten Teile ausgeführt worden sind, ergab sich bereits, dafs das Typhusagglutinin des Ziegenserums innerhalb der Fällungsgrenzen des Euglobulins ausfällt; aus der eben angeführten Versuchsreihe geht weiter hervor, dafs auch die beiden Koaguline*), diesmal in Übereinstimmung

*) Über den Unterschied der beiden Koaguline wurden hier keinerlei Untersuchungen angestellt; dieselben wurden nur im Hinblick auf die beim Pferdeserum konstatierten Differenzen vorläufig auch hier unterschieden. Nur unter der Voraussetzung, dafs die dort gefundenen Verhältnisse auf das Ziegenserum übertragbar wären, ist von den „Koagulinen" in der Mehrzahl gesprochen worden.

mit dem Verhalten jener im Typhuspferdeserum, in gleicher Weise in der Euglobulinfraktion vorzufinden sind. Es sind daher innerhalb der Euglobulinfraktion im Ziegenserum mindestens drei Typhusimmunkörper vorhanden.

Das Verhalten des erhitzten Immunserums ist völlig analog den beim Typhuspferdeserum gemachten Beobachtungen. Während das Erhitzen der Sera auf 60° die Koaguline vollkommen zerstört, bleibt auch hier das Typhusagglutinin intakt. Dieser Unterschied ist hier um so bemerkenswerter, als er mit Sicherheit zeigt, dafs den Koagulinen und dem Agglutinin auch innerhalb der Euglobulinfraktion ein verschiedener Charakter gewahrt bleibt. Ob die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Agglutinins nicht durchgreifend verschiedene sind von denen des Typhuspferdeagglutinins, mufs noch weiter untersucht werden.

Ähnliche Befunde, wie die eben angeführten, ergaben sich auch bezüglich des Cholerapferdeserums.

C. Choleraimmunpferdeserum.

Der hier dem Bakterienkoagulin A zunächst entsprechende Körper der alten Cholerabouillonkulturen wurde in gleicher Weise gewonnen wie jener aus der Typhusbouillon.

Es stand mir zu diesem Zwecke nur eine etwa zwei Monate alte, in Bezug auf Niederschlagsbildung an sich unwirksame Cholerabouillonkultur zur Verfügung; aus 250 ccm dieser durch ein Thonfilter filtrierten Bouillon wurde mit dem achtfachen Volumen absoluten Alkohols eine zähe, stark hygroskopische, braungelbe Masse gefällt, welche, gut abgepreſst und getrocknet, in 20 ccm H_2O aufgenommen wurde. Die klare braune Lösung erzeugte auf Zusatz des Choleraimmunserums innerhalb zweier Stunden bei Zimmertemperatur einen reichlichen flockigen Niederschlag. (Bakterienkoagulin $A_{Chol.}$)

Andererseits wurde aus dreitägigen Choleraagarkulturen durch Extraktion mit 0,6 prozentiger Kochsalzlösung und Filtration dieser Aufschwemmung durch Pukallfilter eine dem Bakterienkoagulin K entsprechende spezifisch wirksame Lösung (Bakterienkoagulin $K_{Chol.}$) hergestellt.

Beide Koaguline erwiesen sich gegen Hitze und Fäulnis ebenso resistent wie die aus Typhuskulturen gewonnenen analogen Produkte, mit denen sie auch die weitgehendste Übereinstimmung in den anderen Eigenschaften zu zeigen scheinen.

Das Choleraimmunpferdeserum, das in der üblichen Weise zur Isolierung des Euglobulins und Pseudoglobulins verarbeitet worden war, besafs in Bezug auf Agglutination einen Titer von 1:20000.

α) Verhalten der beiden Globuline gegenüber dem Bakterienkoagulin $A_{Chol.}$ und $K_{Chol.}$

	Nach sechsstündigem Stehen im Brutschrank
1. 1 ccm Euglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Chol.}$	sofortige Trübung und nachfolgender Niederschlag.
2. 1 ccm Euglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Chol.}$	sofortige Trübung und nachfolgender Niederschlag.
3. 1 ccm Pseudoglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Chol.}$	bleibt klar.
4. 1 ccm Pseudoglobulin + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Chol.}$	bleibt nach tagelangem Stehen klar.

Die hier verwendete Euglobulinlösung war zwei Monate unter Toluol in der Kälte gehalten und später noch längere Zeit bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden. Während das gleichfalls unter Toluol aufbewahrte Immunserum keine Veränderung erfahren hatte, erwies sich die Euglobulinlösung gegenüber den Bakterienkoagulinen $A_{Chol.}$ und $K_{Chol.}$ vollkommen unwirksam; das Agglutinationsvermögen der gleichen Lösung dagegen wies nicht die geringste Einbufse auf, sondern zeigte, wie in ähnlicher Weise beim Typhusimmunserum, eine auffallend schöne Reaktion noch bei einer Verdünnung von 1:40000. (Die Prüfung fand statt gegen eine Kochsalzaufschwemmung einer zwölfstündigen Agarkultur. Die Proben wurden nach sechsstündigem Aufenthalt im Brutschrank verzeichnet.)

β) Verhalten des Choleraimmunserums gegen Erhitzen.

Auch diese Versuche ergaben eine vollständige Übereinstimmung mit den früher beim Typhuspferde- und Typhusziegenserum erhobenen Befunden; sowohl frisches Choleraserum, als auch frisch dargestelltes Euglobulin verloren nach halbstündigem Erhitzen auf 60° im Wasserbade gegenüber den Bakterienkoagulinen $A_{Chol.}$ und $K_{Chol.}$ ihre volle Wirksamkeit, während das Agglutinationsvermögen beider Substanzen, sofern die Temperatur von 60° nicht überschritten wurde, quantitativ erhalten blieb.

	Nach 8 stünd. Stehen im Brutschrank	Nach 24 stünd. Stehen im Brutschrank
1. 1 ccm erh. Choleraser. + 1 ccm Bakterienkoag. $A_{Chol.}$	bleibt klar	bleibt klar.
2. 1 ccm erh. Choleraser. + 1 ccm Bakterienkoag. $K_{Chol.}$ . . .	bleibt klar	spärlicher Bodensatz.

	Nach 8stünd. Stehen im Brutschrank	Nach 24stünd. Stehen im Brutschrank
3. 1 ccm erh. Euglobulin + 1 ccm Bakterienkoag. $A_{Chol.}$ . . .	bleibt klar	bleibt klar.
4. 1 ccm erh. Euglobulin + 1 ccm Bakterienkoag. $K_{Chol.}$ . . .	bleibt klar	spärlicher Bodensatz.

5. Agglutinationsvermögen des Euglobulins vor dem Erhitzen 1:8000, nach dem Erhitzen 1:8000.

Bezüglich des Choleraagglutinins bleibt noch zu bemerken, dafs dasselbe selbst dann, wenn es mit dem Euglobulin isoliert worden war, gegen Temperaturerhöhung viel weniger resistent ist als das Typhusagglutinin, indem ein fünf Minuten lang währendes Erhitzen auf 65° die Agglutinationsfähigkeit vollständig oder zum gröfsten Teil zerstört.

D. Über Beziehungen der spezifischen Koagulination zur Bakterienagglutination.

Aus den angeführten Versuchen ergiebt sich, dafs 1. in den Kulturflüssigkeiten des Typhusbakteriums mindestens drei Substanzen vorhanden sind, welche sich scharf voneinander trennen lassen und welche mit dem Typhusimmunserum teils unter Niederschlagsbildung, teils unter Agglutination der Typhusbakterien reagieren, 2. dafs jedem dieser verschiedenen Bestandteile der Kultur ein besonderer Immunkörper im Serum der typhusimmunisierten Pferde entspricht. Da alle drei Bakterienbestandteile voneinander verschieden sind, so wäre von vornherein die Erwartung berechtigt, dafs jeder der drei Körper, für sich in den Organismus eingebracht, ein für ihn spezifisches Immunserum zu erzeugen im stande wäre. Es seien hier einzelne Versuche angeführt, die zu zeigen geeignet sind, in welcher Richtung sich unsere weiteren Untersuchungen bewegen, um über diese Frage endgültig Aufschlufs zu erlangen, und die zur vorläufigen näheren Charakterisierung des Bakterienkoagulins K dienen mögen.

Schon Widal und Sicard sowie Levy und Bruns[62]) haben gefunden, dafs sterilisierte und filtrierte Kulturen im stande sind, im Tierkörper Immunsubstanzen zu erzeugen, welche Typhusbakterien zu agglutinieren vermögen. Dasselbe hatte auch Nicolle zeigen können, indem er mit filtrierter Typhusglyzerinbouillon Kaninchen immunisierte. Während das auf 115° erhitzte Filtrat keine Immunität herbeiführte, war die „agglutinierende“ Kraft des Serums eines mit nicht erhitztem Filtrat behandelten Kaninchens eine bedeutende. Nicolle schliefst aus seinen Beobachtungen, die in

ähnlicher Weise auch bezüglich der Colikulturen gemacht worden sind, dafs die „agglutinierende“ Fähigkeit des Serums unter dem Einflufs der „agglutinierbaren“ Substanz im Organismus entsteht. Endlich hatte Winterberg gefunden, dafs nur die alkoholfällbare Substanz der alten Typhusbouillonkulturen die Fähigkeit besitzt, im Organismus agglutinierende Substanzen zu erzeugen, während der alkohollösliche Teil keine agglutinierenden Eigenschaften hervorzurufen vermag. In allen diesen Fällen bezogen sich die Untersuchungen auf Bakterienagglutination und es sind erklärlicherweise keine Angaben vorhanden, ob solche Immunsera, die durch Immunisierung von keimfreien Filtraten erhalten worden waren, Niederschläge zu liefern im stande sind.

Da es in unserem Versuche gelungen ist, die ganze wirksame Substanz K in alkoholischer Lösung zu erhalten, so war es von Interesse, zu untersuchen, ob dieser alkohollösliche Teil, der eine prompte Niederschlagsbildung erzielte, auch bei der Einführung in den Organismus Immunität hervorbringen konnte.

25 ccm einer wässerigen Lösung des Bakterienkoagulins K, die durch wiederholte Alkoholfällung von allen alkoholfällbaren Bestandteilen gereinigt worden war, wurden einem Kaninchen von 2030 g Gewicht durch intraperitonale Injektion zu je 4 ccm und 5 ccm in Intervallen von drei Tagen beigebracht. Das Serum des Kaninchens, das vor dem Beginne der Injektion Typhusbakterien zu agglutinieren nicht im stande war, hatte auch bei Beendigung des Versuches keine Agglutinationskraft erlangt.

Demselben Kaninchen werden hierauf in gleicher Weise 18 ccm eines nicht mit Alkohol vorbehandelten Kochsalzextraktes partieenweise beigebracht. Nach dieser Zeit konnte das Blut dieses Tieres bereits in einer Verdünnung von 1:200 innerhalb zweier Stunden die Typhusbakterien zur Agglutination bringen, während die Anwesenheit eines Körpers, der mit dem Bakterienkoagulin A oder K unter Bildung eines Niederschlages reagiert hätte, nicht nachzuweisen war.

Was die überraschende Thatsache anlangt, dafs der alkohollösliche Körper überhaupt nicht im stande war, ein Immunserum zu liefern, so darf nicht aufser acht gelassen werden, dafs möglicherweise die Bildung der Serumkoaguline doch nach längerer Immunisierung aufgetreten wäre, wenn schon die Thatsache, dafs nicht einmal eine Andeutung der Koagulinbildung in der sonst gut wirksamen Bakterienkoagulinlösung auftrat, an sich einige Beachtung verdient. Für eine längere Immunisierungsdauer war leider die zur Verfügung stehende Menge nicht ausreichend; sie hätte dagegen vollständig genügen müssen zur Hervorrufung von Serumagglutininen.

Dieselbe Betrachtungsweise gilt auch für den Immunisierungs-

versuch mit dem Bakterienkoagulin K; auch hier hätte man, sofern nicht andere Bedingungen des Immunisierungsvorganges vorliegen, bei längerer Immunisierungsdauer die Bildung von Serumkoagulin voraussetzen dürfen. Von einer Erklärung dieses merkwürdigen Verhaltens wird vorläufig hier abgesehen; dieselbe soll durch weitere, bereits im Gange befindliche Versuche gefunden werden, über die wir demnächst berichten. Dabei sollen auch die Bedingungen der äufserst bemerkenswerten Bildung der Serumagglutinine unter dem scheinbaren Einflufs des Bakterienkoagulins K erörtert werden, wie sie der zweite Immunisierungsversuch demonstriert und wie sie in analoger Weise nach den oben angeführten Litteraturangaben auch für das Bakterienkoagulin A angenommen werden mufs. Die aus den mitgeteilten Immunisierungsversuchen hervorgehenden Thatsachen dürften schon jetzt dafür sprechen, dafs die Eigenschaft der Bakterienkoaguline (hier speziell des Bakterienkoagulins K), Immunkörper im Organismus zu erzeugen, und jene, das Phänomen der Koagulination in vitro hervorzurufen, sich nicht miteinander decken und in ihrer Wirkungsweise in beiden Fällen von verschiedenen Momenten beeinflufst sind. Es liegt natürlich am nächsten, diese Momente in Änderungen der chemischen Konstitution des wirksamen Moleküls und in dessen dadurch verändertem Verhalten zum intermediären Stoffwechsel im Organismus zu suchen.

Bei der Durchsicht der bisher angeführten Versuche über die Koaguline und Agglutinine ergiebt sich weiter, dafs sowohl im Serum von Pferden wie auch von Ziegen unter dem Einflusse der Typhus- und Cholerabakterienprodukte eine ganze Reihe von Immunkörpern auftritt, die einander in der Wirkung wohl ähnlich, aber voneinander doch sehr verschieden sind. Am prägnantesten tritt dies auf im Typhuspferdeserum. Wir haben hier unter dem Einflufs dreier verschiedenen Bakterienprodukte mindestens ebenso viel verschiedene Immunkörper, die durch chemische, physikalische und biologische Eigenschaften sich als verschiedene Körper charakterisieren lassen. Es ist kaum anzunehmen, dafs die drei Bakterienprodukte, deren Trennung hier gelungen ist, die einzigen Produkte wären, unter deren Einflufs Immunkörper im tierischen Organismus entstehen würden; man darf vielmehr erwarten, dafs ebenso wie die Mannigfaltigkeit der Stoffwechsel- und Zerfallsprodukte der Bakterienleiber ungemein grofs und dabei von den verschiedenartigsten Faktoren, zum Beispiel von den Nähr-

medien und der Abstammung abhängig sein dürfte, auch die Zahl der gebildeten Immunkörper eine äufserst wechselnde sein wird. Die Beobachtung von Kretz[79]), dafs die Empfindlichkeit eines Typhusimmunserums gegen den zur Immunisierung verwendeten Stamm eine ungleich gröfsere ist als gegenüber anderen Typhusstämmen, zeigt bereits, dafs die Immunprodukte von dem Nährboden und der Abstammung des Bakteriums thatsächlich in hohem Mafse abhängen. Bedenkt man dabei, dafs selbst unter der Einwirkung eines und desselben Produktes verschiedene Immunsubstanzen gebildet werden können, wie dies aus der ersten Mitteilung hervorgeht, so wird man zugeben, dafs die Mannigfaltigkeit der zu erwartenden Immunkörper eine ungeheuere sein kann. Es wird dabei auch hier wieder zu berücksichtigen sein, dafs sowohl die verschiedenen Zellen des Gesamtorganismus als auch verschiedene Molekularverbände einer und derselben Zelle vermöge ihrer verschiedenen Funktionen innerhalb des intermediären Stoffwechsels und ihres chemischen Aufbaues in der ihnen eigentümlichen Weise auf die Einwirkung der Bakterienprodukte reagieren werden und dafs sich dies bei der Bildung des Immunkörpers in dessen verschiedenartigem Charakter ausprägen dürfte. Durham[59]) hatte vor kurzem bezüglich der Agglutinine ähnliche Vorstellungen entwickelt, ohne ihnen freilich eine experimentelle Grundlage geben zu können, und erst in neuester Zeit hatte Walker[59]) bei gleichzeitiger Immunisierung von Tieren mit verschiedenen Typhusbakterienvarietäten gefunden, dafs die Agglutinationshöhe eines solchen polyvalenten Serums für die eine oder andere der zur Immunisierung benutzten Varietäten nicht gröfser noch kleiner ist als jene Agglutinationskraft, welche ein monovalentes Serum der zur Immunisierung benutzten Bakterienspezies gegenüber aufweist. So viele Varietäten benutzt worden waren, so viele Agglutinationskurven liefsen sich während der Immunisierung verfolgen.

Die hier gefundenen Thatsachen bilden ein Seitenstück zu den Beobachtungen Ehrlichs und Morgenroths über die Vielheit der hämolytischen Agentien im Blute normaler und vorbehandelter Ziegen und zu den schon erwähnten Befunden von Bordet[59]) und Malkoff[43]) über die Verschiedenheit normaler Blutkörperchenagglutinine.

E. Über die koagulinhemmende Substanz im Typhus- und Cholerapferdeserum.

Erhitzt man Typhusimmunpferdeserum durch eine halbe oder drei viertel Stunden im Wasserbade auf 58 bis 60°, so verliert das-

selbe die Fähigkeit, mit dem Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$, wie auch mit den Kochsalzextrakten von jungen Typhusagarkulturen (Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$) Niederschläge zu erzeugen. Gleichzeitig aber erhält dieses Serum die Eigenschaft, die Bildung solcher Niederschläge, die man etwa durch neuerlichen Zusatz von frischem Typhusimmunserum herbeiführen wollte, zu verhindern. Derartige Versuche gestalteten sich folgendermafsen:

a)

	Nach 24 stündigem Stehen im Brutschrank
1. 1 ccm Immunserum erhitzt + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ + 1 ccm 0,6 prozentige Na Cl	bleibt klar.
2. 1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ + 1 ccm 0,6 prozentige Na Cl	rasch entstehender Niederschlag.
3. (1 ccm Immunserum erhitzt + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$)*) + 1 ccm Immunserum frisch	bleibt klar.
4. (1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$) + 1 ccm Immunserum erhitzt	bleibt klar.
5. (1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Immunserum erhitzt) + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$	bleibt klar.
6. (1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$) + 1 ccm normales Pferdeserum erhitzt	rasch entstehender Niederschlag.

b)

7. (1 ccm Immunserum erhitzt + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$) + 1 ccm 0,6 prozentige Na Cl	bleibt klar.
8. (1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$) + 1 ccm 0,6 prozentige Na Cl	sofortige Trübung u. rascher Niederschlag.
9. (1 ccm Immunserum erhitzt + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$) + 1 ccm Immunserum frisch	bleibt klar.

*) Die Klammer zeigt die Reihenfolge der Zusätze von erhitztem Serum des Bakterienkoagulins $A_{Typh.}$ ($K_{Typh.}$) und des nativen Serums an.

	Nach 24stündigem Stehen im Brutschrank
10. (1 ccm Immunserum erhitzt + 1 ccm Immunserum frisch) + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$	bleibt klar.
11. (1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$) + 1 ccm Immunserum erhitzt	sofortige Trübung und Niederschlag.
12. (1 ccm normales Pferdeserum erhitzt + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$) + 1 ccm Immunserum frisch	sofortiger Niederschlag.

Die Versuche lehren, dafs unter den hier gegebenen Bedingungen das erhitzte Immunserum, in beliebiger Reihenfolge zugesetzt, eine Niederschlagsbildung mit dem Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ zu verhindern vermag; in den mit dem Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$ angestellten Versuchen spielt die Reihenfolge des Zusatzes des erhitzten Immunserums deshalb eine Rolle, weil die Reaktion zwischen dem Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$ und dem Immunserum so rasch eintritt, dafs bereits ein unmittelbar nachfolgender Zusatz des erhitzten Immunserums seine Wirkung nicht mehr zu entfalten vermag; in jeder anderen Reihenfolge wirkt aber auch hier das erhitzte Serum hemmend auf die Niederschlagsbildung ein. In beiden Fällen ist die Wirkung des erhitzten Serums eine spezifische, wie Versuche 6 und 12 zeigen.

Wir sehen hier die merkwürdige Erscheinung, dafs mit der Zerstörung aktiver Eigenschaften des Immunserums plötzlich eine neue Eigenschaft auftritt, die eine der zerstörten entgegengesetzte Wirkung entfaltet. Eine hierher gehörige analoge Beobachtung rührt meines Wissens bisher nur von Müller[63]) her und besteht in dem Nachweis der antihämolytischen Wirkung des erwärmten Meerschweinchenserums auf eine Mischung von Meerschweinchenblut und Kaninchenserum. Die nähere Analyse dieser Erscheinung war indes damals unterblieben, während im vorliegenden Falle die näheren Bedingungen der Wirkung dieser koagulinhemmenden Substanz der einfachen Verhältnisse wegen einem Studium leichter zugänglich waren.

c) Isolierung der koagulinhemmenden Substanz.

Es war zunächst zu untersuchen, welchem Serumanteil diese Substanz angehört. Die folgenden Versuche bieten eine sichere Orientierung darüber. Die aus dem oben angewendeten Typhus-

immunserum durch Salzfällung isolierten Globuline wurden gleichzeitig im Wasserbade eine halbe Stunde auf 60° erhitzt und dann geprüft:

	Nach 12 stündigem Stehen im Brutschrank
1. (1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$) + 1 ccm Euglobulin erhitzt	bleibt klar.
2. (1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$) + 1 ccm Pseudoglobulin erhitzt	flockiger Niederschlag.
3. (1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$) + 1 ccm Euglobulin frisch	flockige Fällung.
4. (1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$) + 1 ccm Pseudoglobulin frisch	flockige Fällung.
5. (1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Euglobulin) + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$	bleibt klar.
6. (1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Pseudoglobulin erhitzt) + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$	sofortige Trübung und Niederschlag.
7. (1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Euglobulin frisch) + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$	sofortige Trübung und Niederschlag.
8. (1 ccm Immunserum frisch + 1 ccm Pseudoglobulin frisch) + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$	sofortige Trübung und Niederschlag.

Während der Pseudoglobulinniederschlag, selbst wenn er längere Zeit bei einer Temperatur von 68° gehalten worden war, nicht den geringsten Einfluſs auf die Niederschlagsbildung nahm, sieht man, daſs die dem erhitzten Immunserum eigentümliche Eigenschaft der Koagulinhemmung einzig auf die Euglobulinfraktion zurückzuführen ist.

Das gleiche Resultat ist durch 14 Tage anhaltende Dialyse zu erzielen; die ausgefallenen Globuline vermögen, durch ein Prozent Kochsalz in Lösung gebracht und einer halbstündigen Erwärmung auf 60° unterzogen, die gleiche hemmende Wirkung zu entfalten. Es befinden sich also in der Euglobulinfraktion sowohl die an der Koagulinbildung beteiligte Komponente wie auch die koagulinhemmende Substanz.

Es war zunächst die Frage zu entscheiden, in welcher Be-

ziehung die beiden Substanzen zu einander stehen, ob etwa die eine Substanz aus der anderen hervorgeht, oder ob beide voneinander unabhängig sind, in zweiter Linie war es wichtig, festzustellen, auf welchen der beiden Körper die koagulinhemmende Substanz einwirkt, sei es auf das Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ resp. Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$ oder auf eines der im Serum befindlichen Koaguline.

Über den Charakter der Substanz konnte zunächst noch in Erfahrung gebracht werden, dafs sowohl Fäulnis wie auch langes Stehen bei Zimmertemperatur die Darstellung dieses Körpers stört. Euglobulin, das lange Zeit bei Zimmertemperatur stand und seine Eigenschaft, Niederschläge zu geben, eingebüfst hatte, lieferte auch beim Erwärmen keine hemmende Substanz mehr. Und dennoch wäre es verfehlt, daraus allein auf einen unmittelbaren Zusammenhang der Koaguline mit der koagulinhemmenden Substanz zu schliefsen, wie folgende Versuche zeigen.

d) Die koagulinhemmende Substanz entsteht unabhängig von den Koagulinen.

Frisches Typhusimmunserum wird mit dem gleichen Volumen Äther versetzt, so viel 95 prozentigen Alkohols dieser Mischung zugesetzt, dafs eine scharfe Schichtung zwischen Serum und Ätheralkohol bestehen bleibt und die Flüssigkeit im Schütteltrichter durch drei bis fünf Minuten geschüttelt. Hierauf wird das so behandelte Serum möglichst rasch nach Wiederherstellung der Schichtung abgelassen. Falls genügende Mengen an Ätheralkohol vorhanden waren, so hat das nun etwas opaleszierende Serum seine Fähigkeit eingebüfst, sowohl mit Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ als auch mit Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$ einen Niederschlag zu geben, aber dennoch nicht die Eigenschaft gewonnen, koagulationshemmend zu wirken. Denn wird zu einem solchen Serum das Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ oder $K_{Typh.}$ in den früher angewandten Verhältnissen zugesetzt und nunmehr zu der Mischung frisches Immunserum, so treten in beiden Fällen innerhalb kurzer Zeit Niederschläge auf. Ein solches mit Ätheralkohol behandeltes Serum gerinnt leicht beim Erhitzen; bereits nach wenige Minuten währendem Erhitzen auf 60° ist das Serum geronnen. Es war daher ohne Zusatz gerinnungswidriger Mittel nicht möglich, zu prüfen, ob die Erzeugung einer koagulinhemmenden Substanz statthaben kann oder nicht. Es wurde zu diesem Zwecke das Serum zu mehr als dem gleichen Teile einer gesättigten Harnstofflösung versetzt und eine halbe Stunde auf 60° im Wasserbade erwärmt. Es ergab sich:

	Nach 24 stündigem Stehen im Brutschrank
1. 1 ccm Immunserum { Äther / Alkohol } erhitzt + 1 ccm Harnstoff + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ + 1 ccm Immunserum frisch	bleibt klar.

	Nach 24stündigem Stehen im Brutschrank
2. 1 ccm Immunserum { Äther / Alkohol } + 1 ccm Harnstoff + 1 ccm Bakterienkoagulin A Typh. + 1 ccm Immunserum frisch	rasch sich bildender massiger Niederschl.
3. 1 ccm Immunserum { Äther / Alkohol } erhitzt + 1 ccm Harnstoff + 1 ccm Bakterienkoagulin K Typh. + 1 ccm Immunserum frisch	erst nach 12 Stunden Auftreten eines spärlichen, feinflockigen Bodensatzes.
4. 1 ccm Immunserum { Äther / Alkohol } + 1 ccm Harnstoff + 1 ccm Bakterienkoagulin K Typh. + 1 ccm Immunserum frisch	massiger Niederschlag.

Man ersieht, dafs durch das Erwärmen auf 60° thatsächlich die koagulinhemmende Substanz wieder erzeugt werden kann und in ihrer Existenz nicht zu verknüpfen ist mit einem der beiden Koaguline. Bei späteren Untersuchungen zeigte es sich, dafs auch ohne Harnstoffzusatz durch zehn Minuten langes Erhitzen des ätheralkoholbehandelten Serums auf 60° die koagulinhemmende Substanz auftritt. Sie kann jedoch in diesem Falle leicht übersehen werden, sobald durch weiteres Erwärmen eine Gerinnung des Serums eintritt; denn durch diese wird in jedem Falle die hemmende Substanz vernichtet.

Weder Behandlung des Koagulums mit Kochsalzlösung, noch aber die Versuche, durch eine Lösung desselben in Harnstoff die koagulinhemmende Substanz zu gewinnen, führten zu irgend einem Resultate. Ist durch genügenden Harnstoffzusatz das Eintreten der Eiweifsgerinnung verhindert worden und wird die Lösung auf eine Temperatur von 80° gebracht, so versagt auch hier die Koagulinhemmung. Die koagulinhemmende Substanz wird also durch Erhitzen auf 80° zerstört.

In anderer als der eben angeführten Weise kann die Unabhängigkeit der hemmenden Substanz von den Koagulinen dadurch dargethan werden, dafs man nicht die Koaguline vernichtet, sondern dieselben durch Koagulination aufbraucht. Ein Serum, das durch Erzeugung spezifischer Niederschläge seine Koaguline vollständig verloren hatte, müfste entsprechend dem eben vorgeführten Versuche trotzdem zur Bildung der koagulinhemmenden Substanz befähigt sein.

Es wurde zu diesem Zwecke Immunpferdeserum mit Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ (Lösung α) und ebenso eine zweite Probe mit dem Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$ versetzt (Lösung β), derart, dafs in beiden Versuchen ein Überschufs der Bakterienkoaguline nachweisbar war; nach eingetretener Niederschlagsbildung wurde die aus beiden Proben vom Niederschlage abgehobene Flüssigkeit durch eine halbe Stunde auf 60° erhitzt und folgendermafsen auf einen Gehalt an „Antikoagulin" geprüft.

	Nach 12stündigem Stehen im Brutschrank
1. 1 ccm erhitztes Serum α + 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ . .	bleibt klar.
2. 1 ccm erhitztes Serum α + 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$ . .	bleibt klar, nach längerem Stehen leicht opaleszierend.
3. 1 ccm erhitztes Serum α + 1 ccm frisches Serumkoagulin A*) + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$	bleibt klar.
4. 1 ccm erhitztes Serum α + 1 ccm frisches Serumkoagulin K*) + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$	bleibt klar.
5. 1 ccm erhitzes Serum β + 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$	bleibt klar.
6. 1 ccm erhitztes Serum β + 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$	bleibt klar, nach längerem Stehen opaleszierend.
7. 1 ccm erhitztes Serum β + 1 ccm frisches Serumkoagulin A + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$	bleibt klar.
8. 1 ccm erhitztes Serum β + 1 ccm frisches Serumkoagulin K + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$	bleibt klar.

Auch diese Versuche zeigen, dafs die Bildung der koagulinhemmenden Substanz unbeeinflufst erfolgt von den Serumkoagulinen, was schon aus dem Umstande hervorgeht, dafs durch Erhitzen einer Serumlösung, die nur das Serumkoagulin A oder K enthält, eine Hemmung sowohl der durch das Bakterienkoagulin K als auch der durch das Bakterienkoagulin A erzeugten Koagulination eintreten kann. Während also eine Spezifizität der Wirkung in diesem Sinne nicht wahrzunehmen ist, bleibt dagegen eine

*) Das Serumkoagulin $A_{Typh.}$ wurde in der Weise hergestellt, dafs nach der Koagulination des Immunserums durch das Bakterienkoagulin K_{Typh} die über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit, welche Serumkoagulin A ohne Serumkoagulin K enthielt, abgehoben wurde; in umgekehrter Weise fand die Darstellung des Serumkoagulins K statt.

solche in betreff der Bakterienspezies nachweisbar. Denn durch eine halbe Stunde auf 60° erhitztes Typhusimmunserum vermag nicht die zwischen dem Cholerapferdeserum mit dem Cholerabakterienkoagulin A stattfindende Reaktion zu hindern.

Einige der hier angeführten Versuche sind auch für das Choleraimmunpferdeserum wiederholt worden, und da zeigte es sich, dafs die Verhältnisse hier ein wenig anders lagen. Es war bereits früher bemerkt worden, dafs ein halbstündiges Erhitzen des Choleraimmunserums auf 60° dasselbe der Eigenschaft beraubt, Niederschläge mit dem Bakterienkoagulin $A_{Chol.}$ und $K_{Chol.}$ zu erzeugen. Die Prüfung dieses Serums jedoch ergiebt, dafs mit der Zerstörung der Koaguline keineswegs das Auftreten einer koagulinhemmenden Substanz einhergeht.

	Nach 12stündigem Stehen im Brutschrank
1. 1 ccm Choleraimmunserum eine halbe Stunde auf 60° erhitzt + 1 ccm frisches Choleraimmunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Chol.}$ . .	leichter, flockiger Niederschlag.
2. 1 ccm Choleraimmunserum eine halbe Stunde auf 60° erhitzt + 1 ccm frisches Choleraimmunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Chol.}$ . .	flockiger Niederschlag.
3. 1 ccm Choleraeuglobulin eine halbe Stunde auf 60° erhitzt + 1 ccm Choleraimmunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Chol.}$	flockiger Niederschlag.
4. 1 ccm Cholerapseudoglobulin eine halbe Stunde auf 60° erhitzt + 1 ccm Choleraimmunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Chol.}$	flockiger Niederschlag.

Es zeigt dies neuerlich, dafs auch hier die koagulinhemmende Substanz nicht unmittelbar durch die Zerstörung der Koaguline entstehen kann, sondern anderen bisher nicht bekannten Momenten ihr Entstehen verdankt. Denn wird dasselbe Choleraserum vorsichtig eine halbe Stunde im Wasserbade bei 73°*) gehalten, ebenso auch das daraus dargestellte Euglobulin, sei es mit oder ohne Harnstoffzusatz, so tritt die koagulinhemmende Substanz auch hier zu Tage.

	Nach 24stündigem Stehen im Brutschrank
1. Choleraimmunserum eine halbe Stunde auf 73°) erhitzt + Bakterienkoagulin $K_{Chol.}$ + frisches Choleraimmunserum	bleibt opaleszierend, kein Niederschlag.

*) Mitunter genügt schon fünf Minuten langes Erhitzen; doch gelang es nicht regelmäfsig, innerhalb dieser Zeit die Koagulinhemmung zu erzeugen.

Nach 24stündigem Stehen im Brutschrank

2. Choleraeuglobulin eine halbe Stunde auf 73° erhitzt + Bakterienkoagulin $K_{Chol.}$ + frisches Choleraimmunserum . . . . . bleibt opaleszierend, kein Niederschlag.

Es bleibt selbstverständlich immerhin noch die Möglichkeit bestehen, dafs irgend ein ätheralkoholbeständiges Koagulin in quantitativ gleicher Menge wie die koagulinhemmende Substanz bereits im frischen Immunserum vorhanden ist, und die Entfaltung der koagulinhemmenden Substanz aufhebt, so dafs die letztere als thermostabile Komponente dieses Systems, obwohl bereits im nicht erhitzten Serum vorhanden, erst nach Zerstörung des thermolabilen Koagulins frei würde. Doch kann mit Sicherheit nach den vorliegenden Versuchen ausgeschlossen bleiben, dafs die hier beobachteten Koaguline durch die Anwesenheit unserer koagulinhemmenden Substanz bereits im frischen Serum in ihrer Wirkung beeinflufst würden.

Einer eben von Müller[68]) gemachten Mitteilung ist die interessante Thatsache zu entnehmen, dafs eine Reihe sonst zum Teil hämolytisch wirkender Sera im inaktiven Zustande bei der Einwirkung von Entenserum auf Kaninchenblut ein Antihämolysin erkennen läfst, welches jedoch bereits im nativen Blut dieser Tiere vorhanden ist. Es ist klar, dafs dieser Befund, wie dies auch Müller thut, zu scheiden ist von dessen früher verzeichneter Beobachtung bezüglich des erwärmten Meerschweinchenserums, und dafs unser „Antikoagulin" nur mit dem letzteren Antihämolysin in Parallele gestellt werden kann.

e) Auf welche Körper wirkt die koagulinhemmende Substanz?

Die Entscheidung darüber war auf verschiedenem Wege möglich. Es schien zunächst zweckmäfsig, über die quantitativen Verhältnisse der bei der Reaktion beteiligten Körper, des erhitzten Serums, des wirksamen Koagulins und des Bakterienkoagulins A_{Typh}*) Aufschlufs zu erlangen in der Hoffnung, auf diese Weise die Abhängigkeit des Phänomens von der wechselnden Menge der einen oder anderen Komponente feststellen zu können und so die Bedeutung derselben für den Ablauf der Reaktion darzuthun. Es

*) Der Einfachheit wegen mögen hier nur die mit dem Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ ausgeführten Versuche mitgeteilt werden; sie wurden meistens in analoger Weise auch mit dem Bakterienkoagulin K_{Typh} mit gleichem Resultate durchgeführt.

wurden daher folgende drei Versuchsreihen angestellt, in deren jeder die Gesamtmenge der verwandten Flüssigkeit mit physiologischer Kochsalzlösung auf 3 ccm aufgefüllt wurde, während die Menge der Komponenten wechselte.

α) Reaktion bei wechselnden Mengen des erhitzten Immunserums und gleichbleibenden des Bakterienkoagulins A und des frischen Immunserums.

	Erhitztes Immunserum ccm	Frisches Immunserum ccm	Bakterienkoag. A Typh. ccm	0,6 proz. Kochsalzlös. ccm	Reaktion nach 12 Stunden im Brutschrank
1	—	1	1	1	Massiger Niederschlag.
2	0,05	1	1	0,95	Massiger Niederschlag.
3	0,1	1	1	0,9	Flockige Fällung.
4	0,2	1	1	0,8	Die Lösung bleibt opaleszierend, spärlich. Bodensatz, kein Niederschlag.
5	0,5	1	1	0,5	Lösung bleibt opaleszierend.
6	1,0	1	1	—	Lösung bleibt opaleszierend.

β) Reaktion bei wechselnden Mengen des Bakterienkoagulins A und gleichbleibenden der beiden Immunsera.

	Erhitztes Immunserum ccm	Frisches Immunserum ccm	Bakterienkoag. A Typh. ccm	0,6 proz. Kochsalzlös. ccm	Reaktion nach 12 Stunden im Brutschrank
1	—	1	0,2	1,8	Nach zwei Stunden mäfsige Flockenbildung.
2	0,1	1	0,2	1,7	Spärliche Flockenbildung.
3	0,1	1	0,4	1,5	Starker, flockiger Niederschlag.
4	0,1	1	0,6	1,3	Massiger, flockiger Niederschlag.
5	0,1	1	0.8	1,1	Massiger, flockiger Niederschlag.

γ) Reaktion bei wechselnden Mengen des frischen, und konstanten des erhitzten Immunserums und des Bakterienkoagulins $A_{Typh.}$

	Erhitztes Immunserum ccm	Frisches Immunserum ccm	Bakterienkoag. $A_{Typh.}$ ccm	0,6 proz. Kochsalzlös. ccm	Reaktion nach 12 Stunden im Brutschrank
1	—	0,1	1	1,9	Massiger, flockiger Niederschlag.
2	—	0,2	1	1,8	Massiger, flockiger Niederschlag.
3	0,1	0,1	1	1,8	Bleibt klar.
4	0,1	0,2	1	1,7	Bleibt klar.
5	0,1	0,4	1	1,5	Bleibt klar.
6	0,1	0,6	1	1,3	Bleibt klar.
7	0,1	0,8	1	1,1	Lösung opaleszier., spärliche Flocken, kein Niederschl.

Aus der Versuchsreihe α geht zunächst hervor, dafs die Wirksamkeit der koagulinhemmenden Substanz eben noch bei einer 15fachen Verdünnung auftritt (Vers. 4). Jedwede höhere Verdünnung setzt die koagulinhemmende Substanz aufser Wirksamkeit und es tritt dann Niederschlagsbildung auf. In diesem Grenzwert, der bei konstanter Menge des Bakterienkoagulins $A_{Typh.}$ und des Immunserums besteht, müfste naturgemäfs schon die geringste Änderung in den Mengenverhältnissen der beiden übrigen Substanzen, sofern sie bei der Niederschlagshemmung in Betracht kämen, zum Ausdruck gelangen. Es wurde demgemäfs bei den beiden folgenden Versuchsreihen die jenseits des Grenzwertes stehende nächste Verdünnung 0,1 gewählt und nun beobachtet, welchen Einfluſs die Variation der Mengen des frischen Immunserums bei konstant bleibenden Mengen des Bakterienkoagulins $A_{Typh.}$ und umgekehrt auf die Niederschlagsbildung hat. Da zeigte sich in der Versuchsreihe β, dafs ein Wechsel der Mengen des Bakterienkoagulins $A_{Typh.}$ nicht den geringsten Einfluſs auf das Auftreten einer Niederschlagshemmung besitzt. Nur dort, wo die Verdünnung des Bakterienkoagulins $A_{Typh.}$ sich der Grenze der Wirksamkeit nähert, wie in Versuch 2, tritt selbstverständlich eine nur spärliche Flockenbildung ein; jedoch in keinem Falle irgend eine Hemmung der Niederschlagsbildung. Ganz andere Verhältnisse zeigt die Versuchsreihe γ. Während 0,1 ccm des erhitzten Serums nicht mehr im stande ist, die Niederschlagsbildung hintanzuhalten,

wenn die Menge des frischen Immunserums das Neunfache beträgt, beginnt sich die Wirkung bereits geltend zu machen bei der nächst niedrigeren Verdünnung. Wir ersehen daraus, dafs der Prozefs der Niederschlagshemmung einzig von der Menge des Immunserums abhängt und durchaus unabhängig ist von der Menge des Bakterienkoagulins $A_{Typh.}$ Es kann demnach unsere koagulinhemmende Substanz nur auf das Immunserum einwirken, keineswegs auf die den Bakterienprodukten entstammenden Körper; die letzteren spielen bei dem Prozesse der Koagulinhemmung eine anscheinend durchaus passive Rolle.

War diese Deutung der drei Versuchsreihen eine richtige, so mufste es auch andererseits gelingen, aus dem unwirksamen Gemenge der drei Körper: erhitztes Immunserum + frisches Immunserum + Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ resp. Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$, wenn die Reaktion nur zwischen den beiden Seren verlief, stets die intakten Bakterienkoaguline $A_{Typh.}$ oder $K_{Typh.}$ nachzuweisen.

Dank der grofsen Resistenz der beiden letzteren Bakterienkoaguline konnte dies in verschiedener Weise geschehen: entweder nach Koagulation der die beiden Sera repräsentierenden Eiweifskörper durch Hitze oder Alkohol, oder durch die minder eingreifende Salzfällung mit nachfolgender Dialyse der Salze oder endlich durch Dialyse allein. Wir bedienten uns zur Wegschaffung der beteiligten Eiweifskörper aus dem unwirksamen Gemisch der ersten drei Methoden.

α)

Die Mischung: 1 ccm Immuneuglobulin auf 60° erhitzt + 1 ccm Immuneuglobulin frisch + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$, bleibt 24 Stunden im Brutschrank, ohne dafs eine Niederschlagsbildung eintritt. Die Flüssigkeit wird nach dieser Zeit bei leicht saurer Reaktion bis zum Aufkochen erhitzt, das gebildete Hitzekoagulum abfiltriert und nun zum neutralen Filtrat 0,5 ccm frisches Immunserum zugesetzt. Es entsteht nach kurzem Stehen im Brutschrank ein massiger Niederschlag; der Zusatz von Choleraimmunserum bringt keinerlei Veränderung hervor, ebenso bleibt die Kontrollprobe: 1 ccm Immuneuglobulin erhitzt + 1 ccm Immuneuglobulin frisch + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ + 1 ccm Immunserum, ohne Niederschlagsbildung.

Der gleiche Versuch wurde mit dem Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$ angestellt.

β)

Aus einem unwirksamen Gemisch von Immunserum erhitzt + Immunserum frisch + Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ wurden durch Zusatz eines grofsen Überschusses 95prozentigen Alkohols die Eiweifskörper gefällt, die alkoholische Lösung filtriert und das Filtrat auf dem Wasserbade bis zur Trockne eingedampft. Dieser Trockenrückstand wurde in der dem Ausgangsvolumen

entsprechenden Wassermenge gelöst und die Lösung geprüft. Auf Zusatz von Immunserum entsteht nach mehrstündigem Stehen im Brutschrank ein schöner flockiger Niederschlag.

Das durch Alkoholfällung erhaltene Koagulin enthält, mechanisch mitgerissen, wie schon frühere Versuche gelehrt haben, ebenfalls Reste des Bakterienkoagulins $K_{Typh.}$; das Koagulum wird daher mit Wasser digeriert und zur klar filtrierten wässerigen Lösung Immunserum zugefügt; auch hier entsteht ein reichlicher flockiger Niederschlag bereits nach kurzem Stehen. In dieser Weise wurde auch das Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$ aus dem unwirksamen Gemenge isoliert.

γ)

Es wurden die beiden Mischungen: 1 ccm erhitztes Immunserum + 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin $A_{Typh.}$, und ebenso: 1 ccm erhitztes Immunserum + 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin $K_{Typh.}$, 24 Stunden im Brutschrank belassen und aus jeder der beiden Lösungen für sich durch halbe Sättigung mit kalt gesättigter Ammonsulfatlösung die Globuline ausgefällt, die Niederschläge filtriert, die Filtrate bis zum Verschwinden des Salzes gegen destilliertes Wasser dialysiert und dann auf Anwesenheit des Bakterienkoagulins $A_{Typh.}$ resp. $K_{Typh.}$ geprüft. Es ergab sich trotz der Verluste, die aus der Dialyse an den Bakterienkoagulinen $A_{Typh.}$ und $K_{Typh.}$ auftraten, Folgendes.

1. 1 ccm der dialysierten Lösung $A_{Typh.}$ + 0,5 ccm Immunserum frisch (Typhus) . .	nach kurzem Stehen flockiger Niederschlag.
2. 1 ccm der dialysierten Lösung $A_{Typh.}$ + 1 ccm Choleraimmunserum	bleibt klar.
3. 1 ccm der dialysierten Lösung $K_{Typh.}$ + 0,5 ccm Typhusimmunserum	rasch entstehender flockiger Niederschlag.
4. 1 ccm der dialysierten Lösung $K_{Typh.}$ + 3 Tropfen Typhusimmunserum	rasch entstehender feinflockiger Niederschlag.
5. 1 ccm der dialysierten Lösung $K_{Typh.}$ + 1,0 ccm Choleraimmunserum	bleibt klar.

Aus allen drei Versuchen geht übereinstimmend hervor, dafs an der hemmenden Wirkung des erhitzten Immunserums die Bakterienkoaguline $A_{Typh.}$ und $K_{Typh.}$ keinen Anteil nehmen und diese Reaktion ausschliefslich zwischen den beiden Seren verläuft. Welcher Bestandteil des frischen Serums mit der koagulinhemmenden Substanz dabei in Reaktion tritt, kann vorläufig nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Es hat sich bei den darauf gerichteten Untersuchungen ergeben, dafs es, wie vorausgesetzt werden konnte, nur der mit dem Euglobulin ausfallende Serumanteil ist, welcher trotz Dialyse oder Erwärmen auf eine Temperatur von

50°, bei welcher das Koagulin an sich nicht geschädigt wird, die Eigenschaft beibehält, mit dem erhitzten Immunserum zu reagieren. Ob jedoch dieses direkt, wie es wahrscheinlich ist, oder mittelbar erst auf das Koagulin einwirkt, müssen weitere Untersuchungen ergeben, wie auch, ob die Erzeugung der koagulinhemmenden Wirkungen beschränkt bleibt auf die durch Bakterienprodukte erzeugten Immunkörper oder sich auch auf Immunkörper erstreckt, die etwa tierischen und pflanzlichen Eiweifskörpern ihr Entstehen im Organismus verdanken, sowie auch auf andere ähnliche Präzipitationsvorgänge normaler Gewebsflüssigkeiten. Über den Komplex dieser Fragen soll später berichtet werden. Es verdient an dieser Stelle hervorgehoben zu werden, dafs die hier beschriebenen Thatsachen mit der Antithrombinwirkung autolysierter Organe, über welche Conradi[78]) vor kurzem aus Hofmeisters Institut ausführlich berichtete, vielfache Analogie erkennen lassen.

f) Beiträge zum Mechanismus der Koagulinhemmung.

Was den Mechanismus der Koagulinhemmung anlangt, so war es ungemein naheliegend, denselben mit den Verhältnissen in Beziehung zu bringen, wie sie in betreff der Gerinnung des Blutes und der gerinnungshemmenden Agentien sowie der Labgerinnung der Milch und der labhemmenden Körper gegeben sind. Gerade in der letzten Zeit wurde für den labhemmenden Körper des normalen Pferdeserums von Fuld und Spiro[24]) der Nachweis erbracht, dafs derselbe nur vermöge seiner Fähigkeit, mit den Kalksalzen eine Verbindung einzugehen, eine labhemmende Wirkung ausüben kann. Auch die direkte Antithrombinwirkung[64]) der verschiedenen Organspaltungsprodukte konnte auf den gleichen Vorgang zurückgeführt werden. Selbst dort, wo ein sicherer Zusammenhang zwischen Kalksalzen und hemmender Wirkung bisher nicht gezeigt werden konnte, wie bei der labhemmenden Wirkung des Peptons auf Milch, kann durch einen Zusatz von solchen die Wirkung des Peptons aufgehoben werden. Es wurde demgemäfs auch hier die Wirkung der Kalksalze neben der Einwirkung von Dinatriumphosphat auf den Ablauf der Reaktion geprüft.

	Nach 24 Stunden
1. 0,5 ccm erhitztes Immunserum + 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin A Typh. + 0,5 ccm physiolog. NaCl-Lösung + 0,5 ccm 10 proz. $CaCl_2$-Lösung	bleibt klar.

	Nach 24 Stunden
2. 0,5 ccm erhitztes Immunserum + 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin A Typh. + 0,5 ccm physiolog. Na Cl-Lösung + 0,5 ccm 10 proz. $CaCl_2$-Lösung	bleibt klar.
3. 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin A Typh. + 1,0 ccm physiolog. Na Cl-Lösung + 0,5 ccm 10 proz. $CaCl_2$-Lösung . . .	massiger Niederschl.
4. 0,5 ccm erhitztes Immunserum + 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin A Typh. + 0,5 ccm Na Cl-Lösung + 1 ccm Dinatriumphosphatlösung	bleibt klar.
5. 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin A Typh. + 1,0 ccm Na Cl-Lösung + 1 ccm Dinatriumphosphatlösung	Niederschlag.
6. 0,5 ccm erhitztes Immunserum + 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin K Typh. + 0,5 ccm physiolog. Na Cl-Lösung + 0,5 ccm 10 proz. $CaCl_2$-Lösung	bleibt klar.
7. 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin K Typh. + 1,0 ccm physiolog. Na Cl-Lösung + 0,5 ccm 10 proz. $CaCl_2$-Lösung . . .	Niederschlag.
8. 0,5 ccm erhitztes Immunserum + 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin K Typh. + 0,5 ccm physiolog. Na Cl-Lösung + 1,0 ccm Dinatriumphosphatlösung	bleibt klar.
9. 1 ccm frisches Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin K Typh. + 1,0 ccm physiolog. Na Cl-Lösung + 1,0 ccm Dinatriumphosphatlösung . .	Niederschlag.

Man ersieht beim Überblick dieser Versuche, dafs weder die Kalksalze noch das phosphorsaure Salz auf die Koagulinhemmung irgend einen Einfluſs ausüben, dafs also diese offenbar nicht auf einer Entziehung von Kalksalzen oder phosphorsauren Salzen beruhen kann und daher auch nicht in ihrem Verlaufe mit den gerinnungshemmenden oder antilabenden Vorgängen übereinstimmt. Dafs speziell bezüglich des letzteren Prozesses keine unbedingte Parallele zu bestehen scheint, geht schon daraus hervor, dafs die koagulinhemmende Eigenschaft nur den im Euglobulin enthaltenen Substanzen zukommt, während die labhemmende Wirkung des normalen Blutes auf der Fähigkeit des Pseudoglobulins, lösliche Kalkverbindungen zu bilden, beruht.

XXVII.

Zur Kenntnis der Immunkörper.

Dritte Mitteilung.

Über die Einwirkung chemischer Agentien auf die Serumkoaguline, Agglutinine, sowie auf den Vorgang der spezifischen Niederschlagsbildung und der Agglutination.

Von Dr. **Ernst P. Pick.**

[Aus dem k. k. serotherapeutischen Institut zu Wien (Vorstand: Prof. Dr. R. Paltauf) und dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolfstiftung" (Vorstand: Dr. E. Freund).]

Schon die bisher vorgeführten Untersuchungen lehren, dafs zwischen den einzelnen Eiweifskörpern der Immunsera, die man bisher als chemische Individuen betrachtet hat, und den im Serum enthaltenen Immunkörpern keine Identität bestehen kann. So finden wir, dafs der Euglobulinniederschlag des mit Typhus immunisierten Pferdes mindestens zwei Immunkörper, die beiden spezifischen Koaguline, das Choleraeuglobulin des Pferdes neben dem Agglutinin höchstwahrscheinlich zwei Koaguline umfafst und ebenso auch das Ziegentyphuseuglobulin. Bedenkt man dabei, dafs neben diesen Immunkörpern noch zahlreiche andere Körper als vorhanden angenommen werden müssen, die bereits dem Serum des nicht immunisierten Tieres eigentümlich sind, so z. B. die Choleraagglutinine des normalen Tieres, die ja ebenfalls im Serum des typhusimmunisierten enthalten sein müssen, so ergiebt sich, dafs wir zunächst im Euglobulinniederschlag zahlreiche Molekulargruppen zu unterscheiden haben, welche bereits im normalen Serum vorhanden sind, wie der Versuch Bordets beweist, und im Immunserum eine bedeutende Anreicherung erfahren. Gelingt es, aus dem Typhuseuglobulin durch spezifische Ausfällung mit den beiden Bakterienkoagulinen A und K die Serumkoaguline quantitativ zu entfernen,

so kann man bemerken, dafs der gröfste Teil des Eiweifsbestandes des Euglobulins intakt bleibt; dennoch sind ihm bereits die beiden Koaguline entzogen worden. Es kann also nur ein sehr geringer Teil des Eiweifses an der Reaktion beteiligt sein, der natürlich nicht mehr alle chemischen Charaktere des Euglobulins aufzuweisen braucht, wenn er sich ihm auch in seinem physikalischen und chemischen Verhalten ähnlich zeigt. Ähnliches und zwar in höherem Mafse gilt von den Agglutininen, was bereits aus Beobachtungen hervorgeht, welche zeigen, dafs Agglutinin zuweilen in eiweifsfreien oder sehr eiweifsarmen Medien angetroffen wird, wie im vollkommen eiweifsfreien Harne (Widal und Sicard[36]) oder im humor aqueus (Levy und Gissler[65]). Hierbei ist freilich stets im Auge zu behalten, wie dies Nencki und Sieber[66]) neuerdings betonen, „dafs der physiologische Nachweis dieser labilen Proteine unvergleichlich empfindlicher als der chemische ist", und wir daher selbst dort, wo wir mit unseren Reagentien Eiweifskörper nicht nachzuweisen vermögen, dennoch an Eiweifsderivate zu denken haben, vorausgesetzt, dafs nicht zwischen der physiologischen Wirkung und der Entfernung der Eiweifskörper ein Gegensatz im Sinne der Zunahme der ersteren gegenüber einer Abnahme der letzteren besteht.

Zur näheren Charakteristik dieser spezifisch wirksamen Stoffe konnte bisher aus leicht begreiflichen Gründen nur Spärliches beigetragen werden und es handelte sich daher zunächst darum, ob die Agglutinine und Koaguline ihrer Natur nach Eiweifsderivaten, oder Kolloiden überhaupt zuzurechnen sind.

Die nachstehenden Untersuchungen beschäftigten sich in erster Linie mit den spezifischen Serumtyphuskoagulinen. Das Verhalten dieser Körper gegen Temperaturerhöhung, gleichgültig ob dieselbe das Immunserum oder das isolirte Euglobulin betraf, sowie ihre grofse Labilität, die schon bei längerem Stehen bei Zimmertemperatur des Euglobulins hervortritt, zeigten bereits, dafs wir es hier nicht mit dem Euglobulin als solchem zu thun haben. Ähnlich wirkende Körper mit analogen physikalischen Eigenschaften sind übrigens im Blutserum schon öfters beobachtet worden. So giebt auch Tchistowitsch[60]) an, dafs bereits eine Temperatur von 60° das gegen Aalserum wirkende antitoxische Kaninchenserum in seiner Fähigkeit, Koaguline zu erzeugen, bedeutend schwächt, und Myers[67]) konnte nachweisen, dafs die Präzipitine für Wittes „Pepton" durch eine Erwärmung auf 56° geschädigt werden. Durch ihre Labilität gegen Temperaturerhöhung werden

die Typhuskoaguline zugleich von ähnlichen Körpern streng geschieden, so von den Bakterienagglutininen und von den ebenfalls minder labilen, rote Blutkörperchen agglutinierenden Substanzen, sowie von den meisten Präzipitinen, soweit die bisherigen Untersuchungen darüber Aufschluſs geben.

Die Zerstörbarkeit durch Erhitzen könnte daran denken lassen, daſs die Koaguline Fermente darstellen, eine Annahme, die leicht zu widerlegen ist. Denn abgesehen davon, daſs wir zeigen konnten, daſs die Koaguline bei der Niederschlagsbildung vollkommen aufgebraucht werden, ein den Fermenten durchaus widersprechendes Verhalten, lieſs sich nachweisen, daſs Fermentgifte, wie Arsentrioxyd und Kaliummetarsenit sowie Rhodankalium*), in keinerlei Weise bei kürzerer oder längerer Einwirkung den Ablauf der Niederschlagsbildung zu beeinflussen vermögen.

Ganz anders jedoch wirken alle Reagentien auf die Koaguline ein, von denen wir wissen, daſs sie bei kürzerer oder längerer Einwirkung die Eiweiſskörper zu verändern vermögen. Es muſsten dabei selbstverständlich alle Reagentien in Wegfall kommen, welche eine tiefergreifende Zerstörung selbst bei kürzer dauernder Einwirkung herbeiführen und von vornherein die Vernichtung aller physiologisch bedeutsamen Vorgänge erwarten lassen, somit nur solche benutzt werden, die einen langsamen Abbau der Eiweiſskörper herbeiführen, ohne notwendig physiologisch aktive Körper, die mit den im Abbau befindlichen Eiweiſskörpern nicht im Zusammenhange stehen, zu zerstören. Dabei kamen in Betracht 1. proteolytische Fermente, 2. Einwirkung von verdünnter Säure und verdünntem Alkali, 3. die Einwirkung von Aminen, Harnstoff und Säureamiden, 4. ferner Einwirkung von Aldehyd, von dem wir wissen, daſs es mit Eiweiſs charakteristische Verbindungen eingehen kann.

Es wurde dementsprechend Immunserum mit den betreffenden Reagentien zusammengebracht, im Brutschrank 12 bis 24 Stunden oder einige Tage hindurch gehalten und dann die Lösung auf Niederschlagsbildung durch Hinzufügung des Bakterienkoagulins A geprüft. Zur Kontrolle wurde die gleiche Mischung, der jedoch sofort der Körper A zugeführt worden war, innerhalb derselben Zeit beobachtet.

---

*) Vier Tropfen einer gesättigten Lösung auf 1 ccm Serum.

a) Einwirkung von Trypsin und Pepsin.

Einige Kubikzentimeter Typhuspferdeimmunserum werden mit einigen Tropfen 20 proz. Sodalösung stark alkalisch gemacht und mit einem gut wirksamen Grüblerschen Trypsin versetzt; die Mischung bleibt unter Zusatz von wenigen Tropfen Toluol fünf Tage lang im Brutschrank bei 38°. Nach dieser Zeit ist noch immer reichlich koagulierbares Eiweifs vorhanden. Auf Zusatz des Bakterienkoagulins A bleibt die Lösung auch bei 24 stündigem Stehen im Brutschrank klar. Es ist daher das entsprechende Serumkoagulin durch die Trypsinverdauung vernichtet worden. Die mit der Sodalösung versetzte, in gleicher Weise behandelte Serumprobe ergiebt auf Zusatz des Körpers A innerhalb 12 Stunden eine massige Niederschlagsbildung, ebenso wie auch die mit Soda, Trypsin und A gleichzeitig beschickte Serumprobe. Die Mischungen Immunserum + Trypsin-Soda sowie Bakterienkoagulin A + Trypsin-Soda bleiben klar. Die Agglutinationsfähigkeit dieses mit Soda und Trypsin verdauten Serums hatte bedeutend abgenommen; während die Ausgangslösung in der Verdünnung von 1 : 20 000 Bakterien agglutinierte, betrug der Titer der verdauten Flüssigkeit 1 : 2000.

Das gleiche Resultat lieferte die mit Pepsin-Chlorwasserstoff verdaute Probe nach fünftägiger Digestion bei Bruttemperatur. Auch hier war die Fähigkeit, Niederschlag zu bilden, vollständig vernichtet worden. Freilich kommt hier, wie wir gleich sehen werden, auch die Einwirkung der Säure in Betracht.

Die mit Pepsin (Grüblersches Pepsin in salzsaurer Lösung) und A gleichzeitig versetzte Probe lieferte innerhalb 12 Stunden einen massigen flockigen Niederschlag, während die Mischungen A + Pepsin-HCl sowie Immunserum + Pepsin-HCl innerhalb dieser Zeit unverändert blieben.

b) Einwirkung von Säure und Alkali.

Immunserum, mit Salzsäure stark angesäuert, verbleibt drei Tage im Brutschrank und wird hierauf bei saurer Reaktion mit dem Bakterienkoagulin A versetzt; die Lösung bleibt klar. Das gleiche Resultat wurde erzielt, wenn mit Soda die saure Reaktion abgestumpft worden war, so dafs die Lösung leicht alkalisch blieb. Die Proben wurden 12 Stunden im Brutschrank gehalten.

Natriumkarbonat erwies sich, wie aus obigem Trypsinversuche

zu ersehen ist, für die Niederschlagsbildung innerhalb der bei dem Versuch eingehaltenen Zeit von drei und fünf Tagen, trotz stark alkalischer Reaktion der Lösung (auf 2 ccm Immunserum, 0,5 ccm 20 proz. Sodalösung), als wirkungslos; die Niederschlagsbildung trat unbehindert innerhalb kurzer Zeit auf.

Behufs Prüfung der Einwirkung freien Alkalis auf das Immunserum wurde Ammoniak verwendet, das die entstandenen Niederschläge nicht in dem gleichen Mafse löst wie z. B. Natron- oder Kalilauge, welche erst nach Neutralisierung mit Säuren eine richtige Beobachtung gestatten. Immunserum, durch tropfenweisen Zusatz konzentrierten, wässerigen Ammoniaks stark alkalisch gemacht, wird gut verschlossen im Brutschrank 12 Stunden gehalten und hierauf, mit der Lösung A versetzt, abermals 12 Stunden bei 38° stehen gelassen; es entsteht kein Niederschlag, die Lösung bleibt vollkommen klar. Eine zweite Probe des Immunserums, gleichzeitig mit der gleichen Ammoniakmenge und der Lösung A beschickt, enthält nach 12 stündigem Stehen einen schönen flockigen Niederschlag, der jedoch nicht so mächtig ist wie in Lösungen von neutraler oder leicht alkalischer Reaktion.

In gleicher Weise wurde auch die Einwirkung dem Ammoniak nahestehender Basen, des Methylamin und Trimethylamin geprüft. Trotz der stark alkalischen Reaktion der Lösungen erfolgte nach 12 stündiger Einwirkung von Methylamin die Reaktion glatt, in der mit Trimethylamin versetzten Probe war die Niederschlagsbildung etwas spärlicher.

Salzsaures Hydroxylamin vermochte nach 12 stündiger Einwirkung auf das Immunserum bei 40° die Niederschlagsbildung vollkommen zu hemmen, während die gleichzeitig mit salzsaurem Hydroxylamin und der Lösung A versetzte Probe innerhalb 12 Stunden einen massigen Niederschlag aufwies.

Es mufs hier natürlich dahingestellt bleiben, ob die Einwirkung des salzsauren Hydroxylamins einer Veränderung des Eiweifskörpers oder einem anderen Umstande zuzuschreiben ist. Da die Anwesenheit des Hydroxylamins an sich, wiewohl es nach Untersuchungen Jacobsons[63]) ein Fermentgift darstellt, keine Störung der Reaktion herbeiführt, so dürfte es erlaubt sein, der ersteren Vorstellung beizupflichten.

c) Einwirkung von Harnstoff und Amiden.

Wir verdanken die Aufklärung der schon seit lange bekannten Einwirkung des Harnstoffs, verschiedener Amide und Basen auf

Eiweifskörper einer in neuester Zeit durchgeführten Untersuchungsreihe Spiros[69]), aus der hervorgeht, dafs diese Körper auf Eiweifs in der gleichen Weise wie Alkalien einwirken, indem sie den Alkalialbuminaten nahestehende Produkte aus demselben erzeugen. Da die Einwirkung dieser Körper eine bei weitem weniger intensive ist als die der fixen Alkalien oder Säuren oder der proteolytischen Fermente, so konnte gerade hier gut beobachtet werden, wie bereits die geringste Veränderung in dem Gefüge der Eiweifskörper auf das Phänomen der spezifischen Niederschlagsbildung einwirkt.

Immunserum, durch 12 Stunden mit wässeriger Benzamid- und Oxamidlösung bei Bruttemperatur stehen gelassen, verliert die Fähigkeit, nachher mit der Lösung A Niederschläge zu bilden; die gleichzeitig mit Immunserum, der Lösung A und der gleichen Benzamid- oder Oxamidlösung beschickten Kontrollproben zeigen innerhalb 12 Stunden eine typische Niederschlagsbildung.

Die in gleicher Weise mit Harnstoff und Schwefelharnstoff ausgeführten Versuche ergeben dasselbe Resultat wie die Einwirkung der genannten Säureamide; auch hier unterbleibt die Niederschlagsbildung, während die unter gleichzeitigem Zusatz der Lösung A aufgestellten Proben Niederschläge aufweisen. Jedoch ist insbesondere bezüglich des Harnstoffs hervorzuheben, dafs bei Anwendung konzentrierter Harnstofflösungen selbst bei gleichzeitigem Zusatz der Lösung A eine vollständige Behinderung der Niederschlagsbildung auftreten kann. Ein Serum, das einige Zeit (12 Stunden) unter der Einwirkung von Harnstoff stand, verliert gleichzeitig die Fähigkeit, in niedrigen Verdünnungen (in unserem Falle noch bei 60facher Verdünnung) Bakterien zu agglutinieren, während bei höheren Verdünnungen, offenbar dort, wo infolge der Verdünnung bereits eine Harnstoffeinwirkung wegfällt, Agglutination auftritt.

Ebenso wie die Prüfung der angeführten Amide wurde auch die Untersuchung von gesättigter, wässeriger Glykokolllösung und von Orthonitrophenol vorgenommen, in beiden Fällen mit negativem Resultate.

d) Einwirkung von Formaldehyd.

Zur Verwendung gelangte das „Formalin“ des Handels, das einer 40proz. Formaldehydlösung entspricht. Immunserum, mit einigen Tropfen dieses Präparates versetzt unter gleichzeitigem Zusatz des Körpers A, vermag Niederschläge nicht mehr zu erzeugen.

Das Serum verliert gleichzeitig die Eigenschaft, durch Hitze koaguliert zu werden. Es mag hier gleich vorweggenommen werden, dafs ein solches Serum selbst in einer Verdünnung, bei der kaum das überschüssige freie Formaldehyd in Betracht kommen kann, so bei einer 200- oder 2000fachen Verdünnung, endgültig seine Fähigkeit, Bakterien zu agglutinieren, eingebüfst hat. Da bereits seit Widal und Sicard bekannt ist, dafs die durch Formol abgetöteten Bakterien noch immer der Agglutination unterliegen, so kann hier die Einwirkung des Formaldehyds nur auf das Immunserum bezogen werden.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen stimmen untereinander darin überein, dafs jede Veränderung, selbst die geringfügigste, welche an dem Eiweifskörper des Serums eintritt, ihm die Fähigkeit raubt, spezifische Niederschläge zu erzeugen. Das zeigen ebenso die proteolytischen Fermente, wie die Einwirkung von freier Säure und freiem Alkali, insbesondere aber jener Körper, bei denen die Zustandsänderung des Eiweifses keine eingreifende sein konnte. Es ist dabei bemerkenswert, dafs die Anwesenheit dieser Substanzen neben dem Bakterienkoagulin A das Entstehen der Niederschläge in den meisten Fällen nicht zu hindern im stande ist, dafs also die Wechselwirkung zwischen dem Bakterienkoagulin A und dem Serumkoagulin eine viel lebhaftere sein mufste als zwischen dem Serumkoagulin und diesen Substanzen. Ob dieses Verhalten, insbesondere das beim Hydroxylamin, Benz- und Oxamid beobachtete, in irgend eine Beziehung gebracht werden kann damit, dafs der Angriffspunkt der basischen Gruppen dieser Körper der gleiche ist wie der des Körpers A, mufs dahingestellt bleiben.

Etwas anders verhält sich der Harnstoff; denn dieser ist nicht allein im stande, bei längerer Einwirkung auf das Eiweifs die Koagulinbildung zu verhindern, sondern vermag auch, wenn in genügend konzentrierter Lösung vorhanden, bei gleichzeitiger Anwesenheit von A die Koagulinbildung zum mindesten bedeutend oder auch vollständig zu hemmen. Dieses Verhalten des Harnstoffs erinnert unwillkürlich an sein gleiches Verhalten bei dem Vorgange der Hitzekoagulation; während Harnstoff bei niederen Konzentrationen den Koagulationspunkt nur in die Höhe treibt, wird bei höherer Konzentration die Gerinnung vollständig gehindert (Spiro); man sieht, dafs hier die Analogie eine vollkommene

ist. Auch sein Verhalten gegenüber der Agglutininwirkung ist ein ähnliches. Dafs gerade höhere Verdünnungen wiederum Agglutination aufweisen, steht ebenfalls in genauer Übereinstimmung mit seiner koagulationshemmenden Wirkung; denn wie hier durch die Verdünnung die Einwirkung des Harnstoffs aufgehoben wurde, so zeigen Versuche Spiros, dafs eine ungerinnbare Eiweifsharnstofflösung, sobald sie durch ausgiebige Dialyse von Harnstoff wieder befreit ist, beim Erhitzen wiederum typisch gerinnt.

Auch bezüglich der Einwirkung des Formaldehyds liegt es nahe, mancherlei ähnliche Vorstellungen zu entwickeln. F. Blum[70]) hatte gefunden, dafs mit Formaldehyd behandelte Eiweifskörper ihre Koagulierbarkeit in der Hitze vollständig einbüfsen; diese Angabe wurde von späteren Autoren, so zuletzt von Leo Schwarz[71]) in ausführlichen Untersuchungen über die Verbindung der Eiweifskörper mit Aldehyden vollkommen bestätigt; auch in unserem Falle war die Formaldehydeiweifsverbindung hitzebeständig und hatte gleichzeitig die Fähigkeit der Koagulin- und Agglutininbildung durchaus eingebüfst.

Die Ergebnisse der Harnstoff- und Formaldehydeinwirkung auf das Koagulin leiten uns zu einer weiteren Untersuchungsreihe, welche auf ganz anderem Wege diese Untersuchungsresultate stützt und im Zusammenhange mit ihnen über den Mechanismus der Koagulin- und Agglutininwirkung weitere Aufschlüsse zu geben geeignet scheint.

e) Einfluſs von Salzen auf die Koagulin- und Agglutininwirkung.

Gelegentlich von Versuchen, die Fällungsgrenzen der beiden Koaguline, vor allem der Typhuskoaguline, gegen Ammonsulfat festzustellen, zeigte sich die merkwürdige Thatsache, dafs, während ein Gehalt der Lösungen von 1 Proz. bis 2 Proz. Kochsalz die Koagulinbildung in keiner Weise oder kaum merklich beeinflufste, bereits so geringe Mengen von Ammonsulfat, wie sie in den Eiweifsniederschlägen bei Ausfällung von geringen Serummengen nach sorgfältigem Abpressen des Niederschlages zurückbleiben, den Ablauf der Reaktion ungemein behinderten oder das Ausfallen eines spezifischen Niederschlages vollkommen aufhoben; waren dagegen gröfsere Eiweifsmengen, so 20 ccm und mehr, verarbeitet worden, so erwies sich der wohl relativ kleinere im Nieder-

schlag zurückgebliebene Salzgehalt für die in wässeriger Lösung nachträglich angestellte Reaktion als indifferent. Wurden die salzhaltigen unwirksamen Lösungen mit Wasser verdünnt, begann sich die Koagulinwirkung geltend zu machen. Es ging schon aus diesen Thatsachen hervor, dafs ein bestimmtes Verhältnis zwischen dem Salzgehalt, dem Eiweifs und mittelbar auch dem Koagulin bestehen müsse, wie dies auch eine zu diesem Zwecke mit Ammonsulfat angestellte Versuchsreihe veranschaulicht.

1. Verhalten der beiden Serumkoaguline gegenüber zunehmendem Salzgehalt bei gleicher Eiweifskonzentration.

Die beiden bezüglich des Serumkoagulins A und K ausgeführten Versuchsreihen wurden in gleicher Weise für sich getrennt angestellt; nur der Kürze und Übersicht wegen mögen sie in einer Tabelle (a. f. S.) Platz finden; die Reihenfolge des Zusatzes bei der Versuchsanstellung war 1. Serum, 2. Bakterienkoagulin A oder K, 3. Salz.

Während die Beeinflussung der Niederschlagsbildung durch das Koagulin A ungemein deutlich ist, indem die Niederschlagsbildung durch einen Salzgehalt von 0,5 Proz. bedeutend gehindert wird, und ein etwas höherer dieselbe vollständig aufhebt, bleibt dasselbe Immunserum gegenüber dem Bakterienkoagulin K in der gleichen Versuchsanordnung in seiner Koagulinbildung beinahe unbeeinflufst.

Die Versuchsreihe soll vorläufig nur lehren, dafs zwischen den beiden Koagulinen ein bedeutender Unterschied auch in ihrem Verhalten bei Anwesenheit von Salzen besteht; dafs jedoch kein prinzipieller Unterschied vorliegt, läfst sich zeigen, wenn man die Versuchsanordnung dadurch empfindlicher gestaltet, dafs die Koagulinwirkung durch Verdünnung etwas abgeschwächt wird.

Protokollnummer a bezieht sich auf Serumkoagulin A, (b) auf Serumkoag. K		Koagulinbildung		Salzgehalt
		des Serumkoagulins A, Niederschlagsbildung nach 12stündiger Zimmertemp. a	des Serumkoagulins K, Niederschlagsbildung nach ½stündiger Zimmertemp. (b)	Proz.
1. a (b)	1 ccm Immunserum + 1 ccm Bakt.-Koag. A (+ 1 ccm Bakt.-Koag. K) + 0,5 ccm H_2O	Nach 2stündig. Zimmertemp. massiger, flockiger Niederschl.	Niederschlagsbildung	—
2. a (b)	1 ccm Immunserum + 1 ccm Bakt.-Koag. A (+ 1 ccm Bakt.-Koag. K) + 0,5 ccm 1proz. Ammonsulfatlös.	Niederschlag, doch schwächer als vorher	Niederschlagsbildung nicht verzögert	0,2
3. a (b)	1 ccm Immunserum + 1 ccm Bakt.-Koag. A (+ 1 ccm Bakt.-Koag. K) + 0,5 ccm 2,5proz. Ammonsulfatlös.	Spärlicher Niederschlag	Niederschlagsbildung nicht verzögert	0,5
4. a (b)	1 ccm Immunserum + 1 ccm Bakt.-Koag. A (+ 1 ccm Bakt.-Koag. K) + 0,5 ccm 5proz. Ammonsulfatlös.	Kein Niederschl. bei Zimmertmp., spärl. Flockenb. nach 22stünd. Brüttemp.	Niederschlagsbildung nicht verzögert	1
5. a (b)	1 ccm Immunserum + 1 ccm Bakt.-Koag. A (+ 1 ccm Bakt.-Koag. K) + 0,5 ccm 10proz. Ammonsulfatlös.	Bleibt klar	Niederschlagsbildung nicht verzögert	2
6. a (b)	1 ccm Immunserum + 1 ccm Bakt.-Koag. A (+ 1 ccm Bakt.-Koag. K) + 0,5 ccm 20proz. Ammonsulfatlös.	Bleibt klar	Sehr geringe Verzögerung der Niederschlagsbildung	4
7. a (b)	1 ccm Immunserum + 1 ccm Bakt.-Koag. A (+ 1 ccm Bakt.-Koag. K) + 0,5 ccm 30proz. Ammonsulfatlös.	Bleibt klar	Der gleiche Befund	6
8. a (b)	1 ccm Immunserum + 1 ccm Bakt.-Koag. A (+ 1 ccm Bakt.-Koag. K) + 0,5 ccm 40proz. Ammonsulfatlös.	Bleibt klar	Der gleiche Befund	8
9. a (b)	1 ccm Immunserum + 1 ccm Bakt.-Koag. A (+ 1 ccm Bakt.-Koag. K) + 0,5 ccm 50proz. Ammonsulfatlös.	Bleibt klar	Der gleiche Befund	10
10. a (b)	1 ccm Immunserum + 1 ccm Bakt.-Koag. A (+ 1 ccm Bakt.-Koag. K) + 0,5 ccm gesätt. Ammonsulfatlös.	Beginn der Eiweifssalzfällung	Beginn der Eiweifssalzfällung	15,3

Zu diesem Behufe wurden nachfolgende Lösungen hergestellt, innerhalb welcher das Koagulin eine fünffache Verdünnung erfuhr; von diesen Koagulinsalzlösungen wurde je 1 ccm mit 1 ccm des Bakterienkoagulins K versetzt und die durch den Salzzusatz herbeigeführte Verzögerung der Niederschlagsbildung bestimmt.

		1 ccm der Mischung mit 1 ccm des Bakterienkoagulins K	Salzgehalt Proz.
1.	2 ccm Immunserum + 8 ccm H_2O + 1 Tropfen gesättigter Ammonsulfatlösung	Sofortiger Niederschlag	—
2.	2 ccm Immunserum + 7,9 ccm H_2O + 0,1 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung	Niederschlag nach wenigen Minuten	0,38
3.	2 ccm Immunserum + 7,8 ccm H_2O + 0,2 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung	Nach ½ Stunde opal., später Trübung und Niederschlagsbildung	0,76
4.	2 ccm Immunserum + 7,5 ccm H_2O + 0,5 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung	Der Niederschlag tritt erst nach mehreren Stunden auf	1,9
5.	2 ccm Immunserum + 7 ccm H_2O + 1 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung	Der Niederschlag tritt erst nach 24 Stunden auf	3,8
6.	2 ccm Immunserum + 6,5 ccm H_2O + 1,5 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung	Der gleiche Befund	5,8
7.	2 ccm Immunserum + 6 ccm H_2O + 2 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung	Nach 24stündigem Stehen nur sehr spärl. Flockenbildung	7,6

Man ersieht auch hier, dafs bei gleichen Mengen des Immunserums die Reaktion ungemein von dem Salzgehalte abhängt, dafs auch hier ein ungefähr 0,8proz. Gehalt der Lösung an Ammonsulfat eine bedeutende Verzögerung der Koagulinbildung herbeiführt, und dafs der wachsende Salzgehalt dieselbe beinahe völlig aufzuheben im stande ist; es ergiebt sich gleichzeitig, dafs die hier nötigen Salzzusätze bedeutend höher sein müssen, um die Koagulinhemmung herbeizuführen, als beim Koagulin A.

2. Einfluſs der Eiweiſskonzentration bei gleichbleibendem Salzgehalt auf die Koagulinwirkung.

Diese Versuchsreihe wurde nur mit dem Bakteriumkoagulin K angestellt; doch ist es klar, daſs auch für das Koagulin A ähnliche Verhältnisse sich ergeben dürften. Die Versuchsanordnung ist der vorhergehenden vollkommen analog.

		1 ccm der Mischung mit 1 ccm des Bakteriumkoag. K	Eiweiſskonzentrat.
1.	2 ccm Immunserum + 6 ccm H_2O + 2 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung	Nach 24stündigem Stehen spärliche Flockenbildung	10fache Eiweiſsverdünnung
2.	3 ccm Immunserum + 5,5 ccm H_2O + 1,5 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung	Nach 5stünd. Stehen Trübung und Niederschlagsbild.	6,6fache Eiweiſsverdünnung
3.	3 ccm Immunserum + 5 ccm H_2O + 2 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung	Der gleiche Befund	6,6fache Verdünnung
4.	5 ccm Immunserum + 3 ccm H_2O + 2 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung	Sofortige Trübung u. rasche Niederschlagsbildung	4fache Verdünnung
5.	7 ccm Immunserum + 1 ccm H_2O + 2 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung	Der gleiche Befund	2,8fache Verdünnung
6.	1 ccm Immunserum + 9 ccm H_2O	Sofortige Trübung u. Niederschlagsbildung	20fache Verdünnung

Es zeigt sich, daſs auch die Konzentration der Eiweiſslösung bei konstantem Salzgehalt auf die Koagulinbildung von maſsgebendem Einfluſs ist. Erhöhte Eiweiſskonzentration wirkt auf die Koagulinbildung beschleunigend, verminderte Eiweiſskonzentration hemmend ein. Daſs nicht etwa die rasche Fällung in den Versuchen 4 und 5 nur durch die relativ geringere Verdünnung bedingt ist und umgekehrt, zeigt die rasche Fällung der 20fach verdünnten Kontrolllösung (6). Diese Versuchsreihe liefert auch die Erklärung dafür, daſs das Koagulin K im unverdünnten

Serum so wenig von dem Salzzusatze berührt worden ist, während im verdünnten Serum, wo der Einfluſs der Eiweiſskonzentration aufgehoben ist, die Salzwirkung deutlich hervortritt.

Da in einer und derselben Lösung und bei demselben Salzgehalt, wie die Versuchsreihe 1 zeigt, die Salzwirkung auf die beiden Koaguline A und K so ungeheure Unterschiede aufweist, so müſste hier die Frage aufgeworfen werden, ob nicht dieser Unterschied begründet ist in der verschiedenen molekularen Konzentration der beiden sonst denselben Titer aufweisenden Koaguline. Die Möglichkeit, daſs dabei die verschiedene Molekulargröſse der beiden Koaguline eine Rolle spielt, kann nicht ohne weiteres von der Hand gewiesen werden.

Da die Bakterienkoaguline A und K als weit von genuinen Eiweiſskörpern abstehende Kolloide von ungemeiner Resistenz aufzufassen sind und nach bisherigen Erfahrungen die hier beobachtete Salzwirkung nicht auf diese Körpergruppen bezogen werden kann, so ist anzunehmen, daſs die Salze nur die Eiweiſskörper des Immunserums beeinflusst und nur durch Vermittelung dieser die Hemmung des Koagulationsphänomens bewirkt haben. Am deutlichsten geht die Beteiligung der Eiweiſskörper an der Niederschlagsbildung gerade aus der letzten Versuchsreihe hervor, in der die direkte Abhängigkeit von der Eiweiſskonzentration gezeigt werden konnte. Über die Art dieser Beteiligung kann man sich allerdings verschiedene Vorstellungen bilden. Am wahrscheinlichsten bleibt immer, daſs bei dem höheren Serumkoagulingehalt der Probe auf gleichem Raume das Zusammentreffen von Serumkoagulin- und Bakterienkoagulinmolekülen entsprechend begünstigt wird. Das gilt aber für jede Reaktion, auch für den Fall, daſs das Serumkoagulin kein Eiweiſskörper wäre.

Die angeführten Versuche stehen ferner im vollen Einklang mit Untersuchungen, welche Pauli[31]) über die Zustandsänderung der Eiweiſskörper angestellt hat und die uns einen tieferen Einblick in die gesetzmäſsige Abhängigkeit der Hitzekoagulation von der Einwirkung der Salze verschafft haben. Ebenso wie Pauli feststellen konnte, daſs die steigende Konzentration des Salzes eine bei verschiedenen Salzen verschiedene Erhöhung des Gerinnungspunktes herbeiführt, so zeigt sich auch in unseren Versuchen in weitestem Maſse die gleiche Abhängigkeit der Koagulinbildung; bezüglich des Einflusses der Eiweiſskonzentration auf die Gerinnungstemperatur mag daran erinnert werden, daſs die Verhältnisse insofern ähnlich liegen, als eine Zunahme des Eiweiſs-

gehaltes im Sinne einer Erniedrigung der Koagulationstemperatur, bei dem Koagulin im Sinne einer beschleunigten Niederschlagsbildung wirkt. Endlich darf nicht vergessen werden, dafs ebenso wie der Vorgang der Koagulation an gewisse kleine Mengen von Salzen geknüpft ist, indem salzfreie Lösungen nicht koagulieren, auch bei unserem Phänomen der spezifischen Niederschlagsbildung der Salzgehalt schon deshalb eine grofse Rolle spielt, weil er zur Lösung der beteiligten Eiweifskörper unbedingt nötig ist.

Man ersieht so, dafs der Mechanismus der spezifischen Niederschlagsbildung, oder besser der spezifischen Koagulination, der Koagulation der Eiweifskörper durch Hitze nahe steht und wohl auch von ähnlichen Gesichtspunkten aus weiter zu untersuchen sein wird.

Im Anschlufs mögen hier noch Versuche Erwähnung finden, die darthun, dafs jene besonderen Verhältnisse, wie wir sie bei der Gerinnung des Blutes oder bei der Labung der Milch vorfinden, für die spezifische Koagulination nicht von Bedeutung zu sein scheinen.

f) Einfluſs gerinnungshemmender Stoffe auf die Koagulination.

Es kam hier zunächst darauf an, zu untersuchen, ob die Kalksalze bei der Niederschlagsbildung irgend eine Rolle spielten.

1 ccm Immunserum + 1 ccm Bakterienkoagulin A + 1 ccm 5 proz. $CaCl_2$-Lös.,
1 „ „ + 1 „ „ K + 1 „ 5 proz. „
In beiden Proben Niederschlagsbildung in gleicher Weise wie ohne $CaCl_2$-Zusatz.

Man gewann bei verschiedentlich angestellten Proben den Eindruck, dafs eine geringe Beschleunigung des Prozesses bei Anwesenheit der Kalksalze eintritt, doch war diese Erscheinung zu unregelmäfsig, um daraus einen sicheren Schlufs ziehen zu können. In ähnlicher Weise verhielten sich die Proben bei Zusatz von Lösung von Dinatriumphosphat.

Eine Probe des Typhusimmunpferdeserums wurde mit einer Lösung von oxalsaurem Ammon versetzt und die Mischung 24 Stunden stehen gelassen; vom ausgeschiedenen Kalkniederschlage wurde die klare, kalkfreie Lösung abgehoben und geprüft.

1. 0,5 ccm Lösung + 0,5 ccm Bakt.-Koag. A: nach 2 stünd. Stehen Niederschl..
2. 0,5 „ „ + 0,5 „ „ K: rasche Flockenbildung.
3. 1 ccm Bakt.-Koag. A + einige Tropfen oxalsauren Ammons: bleibt klar.
4. 1 „ „ K + „ „ „ „ „ „

Von einer 10proz. Lösung von neutralem zitronensauren Natron wird zu einer Probe des Typhusimmunpferdeserums das gleiche Volumen hinzugefügt, ebenso zu einer Immunglobulinlösung: beide Mischungen werden durch Zusatz der Lösung A und K geprüft.

1. 0,5 ccm Immunserum + Natriumcitrat + 0,5 ccm Bakterienkoagulin A: nach zwei Stunden Niederschlagsbildung;
2. 0,5 ccm Immunserum + Natriumcitrat + 0,5 ccm Bakterienkoagulin K: nach einigen Minuten Niederschlagsbildung;
3. 0,5 ccm Immuneuglobulin + Natriumcitrat + 0,5 ccm Bakterienkoag. A: nach zwei Stunden Niederschlagsbildung;
4. 0,5 ccm Immuneuglobulin + 0,5 ccm Bakterienkoagulin A: Niederschlagsbildung wie vorher.

Ein gleich negatives Resultat lieferte der Zusatz von Blutegelextrakt zu einer Mischung von Immunserum und Bakterienkoagulin A; auch hier war, ebenso wie in der ohne Blutegelextrakt aufgestellten Probe, eine rasche Niederschlagsbildung zu erzielen.

Nach den Ergebnissen dieser Versuchsreihe darf wohl geschlossen werden, dafs bei der Koagulination ganz andere Momente in Betracht kommen als bei der Blut- oder Milchgerinnung und dafs insbesondere die gewöhnlichen Kalksalze dabei keine erhebliche Rolle spielen. Sicher geht aber aus der Versuchsreihe hervor, dafs die beiden Koaguline nichts zu thun haben mit der labähnlichen Substanz des normalen Euglobulins, deren fermentative Wirkung nach Fuld und Spiro an das Vorhandensein von Kalksalzen geknüpft ist.

Was die Einwirkung der Salze auf das Agglutininphänomen anlangt, so bestehen bereits zahlreiche, bisher freilich zumeist nicht einheitlich aufgefafste Beobachtungen dieser Art. In Beziehung mit den bekannten Untersuchungen Buchners über den Einfluſs der Neutralsalze auf die Serumalexine, aus denen Buchner unter anderem schloſs, dafs sich die Salzfunktion nur auf die eiweifsartigen Bestandteile des Serums beziehen könne, dafs also die Alexine Eiweifskörper sein müfsten, ähnlich wie dies Gürber[38]) bezüglich der hämolytischen Substanzen des Blutserums später feststellte, hatte zuerst Bordet[39]) gefunden, dafs nur bei Anwesenheit von Kochsalz die „Reagglutination“ *) von Bakterien erfolgt, während sie bei einer Aufschwemmung im destillierten Wasser unterbleibt. Levaditi[72]) hatte beobachtet, dafs Kalksalze (Calciumdiphosphat, Calciumchlorid) in gewissen Mengen die Agglutinierung verstärken; doch erfolgt sie ebenfalls in mittels Natriumoxalats oder durch Dialyse entkalkten Lösungen. In neuester Zeit hatte endlich Joos[73]) nachgewiesen, dafs in salzfreien Lösungen keine Agglutination stattfindet; erst auf Salzzusatz ist es möglich, wiederum Agglutination zu erzielen. Diese Beob-

*) Siehe Anmerkung ** S. 461.

achtung von Joos, die wiederum ihre vollkommene Analogie in der Erscheinung findet, dafs salzfreie Eiweifslösungen einer Koagulation nicht unterliegen, im Zusammenhange mit den Befunden, dafs auch die Anwesenheit von Harnstoff und Formaldehyd die Agglutination zu hindern oder aufzuheben vermag, sowie das Verhalten gegen Trypsinverdauung spricht schon jetzt mit gröfster Wahrscheinlichkeit dafür, dafs es sich auch hier um eine ähnliche Beeinflussung der Eiweifskörper des Immunserums handle wie bei den Koagulinen.

Bei unseren Versuchen, welche die Einwirkung von Ammonsulfat auf die Koagulinwirkung betrafen, liefs sich bei den angewandten, geringen Konzentrationen der Salze eine Beeinflussung der Agglutinine in augenfälliger Weise wie bei den Koagulinen nicht nachweisen; doch ist es wahrscheinlich, dafs sich auch bezüglich der Agglutinine eine ähnliche Abhängigkeit von der Salzwirkung ergeben dürfte*). Ob es sich auch hier um einen der Koagulation der Eiweifskörper analogen Vorgang handelt, wie bereits Duclaux[74]) vermutete, müssen weitere Untersuchungen, die von anderer Seite (Eisenberg und Volk) bereits im Gange sind, feststellen.

g) Charakterisierung der durch die Koagulination erhaltenen spezifischen Niederschläge und der Mechanismus der Koagulination.

Da durch die bisherigen Untersuchungen festgestellt werden konnte, dafs von den beiden an der spezifischen Koagulination beteiligten Substanzen nur die eine sichere Kennzeichen von Eiweifskörpern aufweist, während die andere, von den Bakterien stammende, keine solchen, oder nur jene weit abstehender Eiweifsspaltungsprodukte zeigte, so konnte die Möglichkeit ins Auge gefafst werden, durch Untersuchung des Niederschlages weitere Anhaltspunkte für die Natur der Eiweifskomponente zu erlangen, zumal eine weitere Isolierung derselben aus dem Immunserum bezw. aus dem Euglobulin, ihrer leichten Zersetzlichkeit wegen, auf grofse Schwierigkeiten stiefs.

*) Es bleibt hierzu zu bemerken, dafs die Ricinwirkung, deren Ähnlichkeit mit der Bakterienagglutination des öftern betont wurde (Elfstrand[75]) nach Untersuchungen von Ehrlich[1]) auch bei Anwesenheit von Salzlösungen eintritt, so bei Anwesenheit von NaCl, KNO_3 und $KClO_3$, selbst in gesättigter Lösung.

Es wurde zu diesem Zwecke aus Immunpferdeserum durch Ammonsulfatfällung isoliertes Euglobulin zu gleichen Teilen mit dem Bakteriumkoagulin K versetzt und, nachdem sich ein gut abgegrenzter Niederschlag entwickelt hatte, die überstehende Lösung abgehoben und der zurückbleibende Niederschlag durch Dekantation mit destilliertem Wasser so lange gewaschen, bis die Waschwässer keine Biuretreaktion mehr zeigten*).

Der so erhaltene Niederschlag stellt eine weifse, grobflockige Masse dar, die durch Neutralsalze [Kochsalz, gleiches Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung]**) nicht mehr in Lösung gebracht werden kann, ebenso wenig durch Soda, dagegen in Natronlauge leicht löslich ist und in dieser Lösung eine schöne violette Biuretreaktion liefert; aus der alkalischen Lösung kann durch Neutralisierung mit Essigsäure eine teilweise Fällung (manchmal leichte Opaleszenz) erzeugt werden. Auf Zusatz von Essigsäure erfolgt ebenfalls eine teilweise unvollständige Lösung des Niederschlages. Mit Millons Reagens giebt der Niederschlag beim Kochen schön rot gefärbte Flocken, doch bleibt die Reaktion nach Molisch negativ; beim Verbrennen auf dem Platinblech verkohlt die Substanz unter Entwickelung von Geruch nach sublimierendem Leucin und verbrennt ohne Hinterlassung von Asche. Der Nachweis von

*) Trotz dieser aufs sorgfältigste vorgenommenen Reinigung, die an einem zweiten Präparate mit 1proz. NaCl-Lösung vorgenommen wurde, wäre es bei der grofsen Empfindlichkeit der Biuret- und Millon-Reaktion noch immer möglich, dafs, trotzdem die Waschwässer längst keine Biuretreaktion aufwiesen, dem Niederschlag mechanisch anhaftende Serumreste die Biuretreaktion und event. die Millonsche Reaktion vorgetäuscht hätten. Indes zeigen die übrigen Reaktionen, dafs eine Verunreinigung mit mechanisch mitgerissenen, unveränderten Serumbestandteilen kaum in Betracht kam.

**) Wird eine wässerige, milchig opaleszente Aufschwemmung des durch Koagulination erhaltenen Niederschlages hergestellt, so kann man nach Salzzusatz (Ammonsulfat) gut beobachten, dafs die einzelnen aufgeschwemmten Teilchen unter dem Einflufs des zugesetzten Salzes sich wieder zu Flocken vereinigen. Bordet hatte Ähnliches bei agglutinierten Bakterien, die er im destillierten Wasser aufgeschwemmt hatte, auf Kochsalzzusatz beobachtet und diese Erscheinung Reagglutination genannt. Sie ist jedoch wohl prinzipiell von den durch die Agglutination gesetzten Zustandsänderungen zu trennen, wie auch jene bei der Aufschwemmung des koagulinierten Niederschlags beobachtete Salzwirkung mit der Erscheinung der Koagulination nichts gemein haben kann, und nur ein sekundäres, auf die bereits koagulinierte Verbindung physikalisch einwirkendes Moment darstellt.

Phosphor im Niederschlag konnte bei der zur Verfügung stehenden geringen Menge nicht mit Sicherheit geführt werden.

Bei Verdauungsversuchen mit Pepsin und verdünnter Salzsäure sowie mit Soda und Trypsin erwies sich die Substanz des Niederschlages als ungemein resistent; selbst wochenlanges Einwirken von gegen Fibrin ausgezeichnet wirksamen Verdauungslösungen bei Bruttemperatur hatte keine oder kaum merkliche Lösung des Niederschlages zur Folge.

Der gleiche Versuch wie mit dem Bakteriumkoagulin K wurde mit dem Bakteriumkoagulin A ausgeführt; die Reaktionen des hier resultierenden Niederschlages ergaben durchaus das gleiche Resultat wie bei dem durch das Koagulin K erzeugten Produkt, insbesondere die gleiche Resistenz gegen Pepsin- und Trypsinverdauung. In einem Versuche, in dem der Niederschlag wochenlang mit 1 proz. Kochsalzlösung gewaschen worden war, erwies sich die endlich erhaltene Substanz, die gewöhnlich in verdünnter Natronlauge leicht gelöst werden konnte, als selbst in konzentrierter Lauge schwer löslich; auch in dem durch das Koagulin A erzeugten Niederschlag liefs sich nicht mit Bestimmtheit Phosphor nachweisen.

Die Reaktionen lassen bei beiden Körpern keinen Zweifel zu, dafs wir es hier mit Eiweifskörpern zu thun haben, deren hervorstechendstes Merkmal neben dem Fehlen einer Kohlenhydratgruppe die Unlöslichkeit in Neutralsalzen und Soda und die ungemeine Widerstandsfähigkeit gegenüber verdauenden Fermenten bildet. Aus dem Fehlen der Kohlenhydratgruppe ist schon leicht zu entnehmen, dafs nur ein Teil des Euglobulinniederschlages an der Koagulination beteiligt sein kann, der von vornherein keine Kohlenhydratgruppe enthält.

Das Verhalten des Körpers gegenüber Säuren und Alkalien, insbesondere dessen teilweise Fällbarkeit aus alkalischer Lösung durch Essigsäure, sowie dessen unvollständige Löslichkeit in dieser Säure mahnt an das Verhalten von Alkalialbuminaten, denen jedoch hier die schwere Löslichkeit in Soda gegenübersteht, sowie die Unverdaulichkeit durch Pepsin und Trypsin; doch ist die Angreifbarkeit mancher Eiweifskörper durch Alkali und Fermente eine ähnlich geringe. Die Widerstandsfähigkeit des Hemiproteins von Schützenberger, des Antialbumids von Kühne gegen Säure und Verdauungsfermente, des Papayotin-Albumosenniederschlags von Kurajeff[80]) gegen Papayotin sind Beispiele solcher spezifischen Resistenz.

Da wir nun wissen, dafs die beiden Bakterienkoaguline A und K sowohl gegen Pepsin- wie auch gegen Trypsinverdauung die gleiche Resistenz zeigen wie der durch die Koagulination erhaltene Niederschlag, anderseits sowohl die Bakterienkoaguline wie auch die Serumkoaguline bei dem Prozefs der Koagulination aufgebraucht werden, so kann die grofse Resistenz des Niederschlags am einfachsten durch die Annahme erklärt werden, dafs bei der Koagulination eine Vereinigung der Bakterienkoaguline mit den Serumkoagulinen in der Art erfolgt, dafs die Bakterienkoaguline an jener Stelle des Serumkoagulinmoleküls eintreten, die allein dem Angriff des Pepsins und Trypsins zugänglich ist. Eine durchaus übereinstimmende Analogie bietet das unkoagulierbare Formaldehydeiweifs, von dem Schwarz annimmt, dafs seine Unangreifbarkeit durch Trypsin dadurch bedingt sei, dafs Formaldehyd im Eiweifsmolekül die Stelle des Angriffspunktes für Trypsin einnimmt. Auch Jacoby[61]), der Ricin bei der Trypsinverdauung resistent findet, fafst die Möglichkeit ins Auge, dafs dem Ricin die Struktur mangelt, welche als Angriffspunkt für das Ferment nötig ist. Es wäre von Interesse, in dieser Beziehung auch die von Jacoby beschriebenen spezifischen Ricinniederschläge, die eine vollständige Analogie mit den spezifischen Niederschlägen der Typhusimmunsera zeigen, kennen zu lernen.

Jene Versuche, welche sich auf das Studium der Natur des Serumkoagulins beziehen, zeigen bereits, dafs es Eiweifsbestandteile des Serums sind, welche den Hauptanteil der Niederschläge ausmachen müssen, dafs sie allein einer Art Koagulation unterliegen.

Die Untersuchung des Niederschlages bestätigt vollkommen das Resultat der früheren Versuche, denn da die Bakterienkoaguline keine oder nur spärliche Eiweifsreaktionen mehr geben, können diese nur von der Serumkomponente herrühren. Es wäre freilich denkbar, wenn auch höchst unwahrscheinlich, dafs die durch den Eintritt des Bakteriumkoagulins entstehende neue Verbindung Eiweifsreaktionen darböte, während die beiden in Verbindung tretenden Komponenten keine aufwiesen. Diese Möglichkeit ist indes in unserem Falle schon dadurch ausgeschlossen, dafs die Substanzmenge des gereinigten Bakteriumkoagulins gegenüber der Masse des entstehenden Niederschlages eine so geringe ist, dafs an einen synthetischen Vorgang in dem angedeuteten Sinne nicht gedacht werden kann. Es ist aber auch andererseits mit diesen Thatsachen kaum vereinbar, das Bakteriumkoagulin als die an der

Koagulination passiv beteiligte Komponente anzusehen, vielmehr zwingen sowohl die Natur der Bakteriumkoaguline als auch die der Serumkoaguline wie auch der Charakter der bei der Reaktion beider Körper aufeinander entstehenden Produkte zu der Annahme, in dem Bakterienkoagulin das chemisch aktive Agens, in dem Serumkoagulin den passiven Komplex, das wesentliche Substrat der Reaktion, zu suchen.

Es wird nunmehr zu untersuchen sein, inwiefern die hier angeführten Thatsachen auch bei den Koagulinen anderer Bakterien und jener von normalen Eiweifskörpern anzutreffen sind; die bisher vorliegenden, besonders von Myers erhobenen Befunde sprechen dafür, dafs die Präzipitate der Immuneiweifskörper ein von den Koagulinationsprodukten abweichendes Verhalten zeigen.

h) Versuche zur Isolierung des Serumagglutinins.

Nicht in gleicher Weise wie bei den Koagulinen gelingt es bei der Agglutination, durch Untersuchung des Reaktionsproduktes Aufschlufs über die Serumkomponente zu erlangen, da infolge der Agglutination nicht allein das Bakterienagglutinin, sondern das ganze Bakterium in das Reaktionsprodukt mit eingeht; aufserdem scheint an der Bakterienagglutination eine so ungemein geringe Menge der Eiweifskörper des Serums beteiligt zu sein, dafs bisher selbst mikroskopisch ein Reaktionsprodukt derselben nicht wahrgenommen werden konnte, und wir eben nur aus dem Momente der Zusammenballung der Bakterien auf die Existenz eines solchen schliefsen.

Schon die Möglichkeit des Erreichens einer so hohen Wertigkeit eines nicht fermentativ wirkenden Eiweifskörpers innerhalb der gegebenen Blutmenge des Organismus läfst vermuten, dafs die einzelnen Komplexe dieses wirksamen Körpers klein sein müssen, ceteris paribus (abgesehen von der verschiedenen Reaktionsfähigkeit verschiedener Zellen) viel kleiner als die Koaguline. Wir werden daher bei der grofsen Reaktionsfähigkeit dieses Eiweifskörpers und der geringen dabei beteiligten Masse derselben, die bereits an die Wirkung von Fermenten erinnert, nicht verwundert sein dürfen, auch im mikroskopischen Bilde nichts von dem Reaktionsprodukte zu entdecken, zumal, wie verschiedentlich schon angenommen wurde, die Reaktion in der Hülle oder im Bakterienleibe vor sich gehen kann. Es ist aber auch klar, dafs sich dieser Vorgang nicht veranschaulichen läfst durch in die

Kulturflüssigkeit eingetragene, feinst verteilte anorganische Partikelchen, da diese immer noch viel zu grob und grofs sind, um etwa auch nur annähernd mit der Masse des reagierenden Serumagglutinins verglichen zu werden. Dementsprechend wird auch die Ausbeute an Serumbestandteilen, die aus den agglutinierten Bakterien zu gewinnen wäre, stets nur eine minimale sein können, und einer weiteren chemischen Bearbeitung wohl nur schwer zugänglich sein. Hahn und Trommsdorf[76]) haben interessanterweise, ausgehend von der Gruberschen Beobachtung, dafs bei der Agglutination die Agglutinine verbraucht würden, auch versucht, aus agglutinierten Typhus- und Cholerabakterien durch Digestion mit frischem und inaktiviertem Serum verschiedener Tierspezies, sowie durch verdünnte Säuren und Laugen das Agglutinin zu extrahieren, und erhielten mit beiden letzten Mitteln schwach agglutinierende Lösungen, deren weitere Charakterisierung in Aussicht steht.

Ich habe versucht, das aus dem Pferdeimmunserum dargestellte Agglutinin von den anhaftenden Eiweifskörpern möglichst zu reinigen, in der Hoffnung, auf diesem Wege bessere Resultate zu erlangen, zumal sich im Laufe der Untersuchung herausstellte, dafs das Serumagglutinin im eiweifsarmen Zustande besonders gegen Temperaturerhöhung eine hohe Resistenz zeigt, die es von den Koagulinen unterscheidet und abermals dafür spricht, dafs das Serumagglutinin viel einfacher gebaut ist als jene, worauf schon unter anderem sein Verhalten gegenüber Salzen und seine Löslichkeit in salzfreien Lösungen hinweisen.

Durch wiederholte Salzfällung gereinigtes Immunpseudoglobulin wird, um die Gerinnung zu verhindern, mit dem gleichen Volumen gesättigter Harnstofflösung versetzt und langsam im Wasserbade auf 100° erhitzt und fünf Minuten lang gekocht. Die Prüfung des Agglutiningehaltes vor dem Erhitzen ergiebt einen Grenzwert bei der Verdünnung von 1 : 4000, nach dem Erhitzen eine prompte Agglutination bei einer Verdünnung von 1 : 6000.

In diesem Falle war die Lösung nicht höher ausgewertet worden, doch dürfte sie, nach der Stärke der Agglutination beurteilt, eines noch höheren Verdünnungsgrades fähig gewesen sein. Ein längeres Erhitzen der Lösung, selbst bei einer niedrigeren Temperatur, so bei 80° bis 90° eine halbe Stunde hindurch, schädigt dagegen die Serumagglutinine bedeutend. Der Versuch zeigt, dafs die Agglutinine an sich kurzes Kochen vertragen, sobald die Gerinnung der Eiweifskörper gehindert wird.

Es wurde nunmehr die gleiche Pseudoglobulinlösung ohne Harnstoffzusatz fünf Minuten lang bei 75° im Wasserbade gehalten, das feinflockige Koagulum sogleich in Harnstoff gelöst und geprüft. Die Lösung enthielt keine agglutinierende Substanz mehr, ebenso wenig das wässerige Filtrat des Koagulums.

Durch die Koagulation der Eiweifskörper war demnach das Agglutinin völlig zerstört worden.

Dieses Parallelgehen des Agglutinins mit den Eiweifskörpern des Serums, speziell mit denen des Pseudoglobulins, läfst sich noch deutlicher dann demonstrieren, wenn man die gleiche Prozedur mit einem Euglobulin vornimmt, welches Reste von Serumagglutinin mechanisch eingeschlossen enthält, die demselben ungemein schwer durch Ausfällung zu entziehen sind. Wird solches Euglobulin bei etwa 80° koaguliert, bei welcher Temperatur die Spuren ihm anhaftenden Pseudoglobulins gelöst bleiben, so erhält man ein massiges Koagulum, dem auf keine Weise agglutinierende Substanz mehr zu entziehen ist, während das Filtrat des Koagulums mit seinen Pseudoglobulinresten prompt agglutiniert.

Alle diese Angaben beziehen sich auf das Typhusserumagglutinin des Pferdes. Ganz anders liegen die Verhältnisse bei dem Choleraagglutinin der gleichen Spezies. Es wurde bereits angeführt, dafs selbst das spezifische Euglobulin nicht Temperaturen über 65° verträgt, ohne dafs die agglutinierende Wirksamkeit mehr oder weniger völlig zerstört wurde; auch hier fällt es schwer, den Einflufs des Eiweifskörpers auf die relative Labilität dieses Agglutinins auszuschliefsen. Da die Zerstörung des Agglutinins schon vor der Koagulation des Euglobulins eintrat, so gelang es auch nicht, durch Harnstoff oder Salzzusatz die Haltbarkeit des Agglutinins besonders zu beeinflussen. Ein drei Minuten und fünf Minuten langes Erhitzen auf 73°, wobei die Lösungen nur leicht opaleszent wurden, beraubte sie jedweder Agglutinationsfähigkeit. Man erkennt daraus, dafs das Choleraagglutinin wohl ein labileres Molekül darstellen dürfte als das Typhusagglutinin, und auch, wie sehr die Resistenz der Immunkörper von der Natur des ihnen eigentümlichen Eiweifskomplexes abzuhängen scheint. Die praktische Bedeutung dieser Thatsache bedarf keiner weiteren Beleuchtung.

Behufs näherer Charakteristik des Agglutinins der Pseudoglobulinfraktion wurde dieselbe nach wiederholter Fällung mit Ammonsulfat der Alkoholfällung unterzogen. Durch Vorversuche wurde festgestellt, dafs beinahe sämtliche agglutinierende Substanz bei einem Gehalt der Lösung von etwa 60 Prozent an Alkohol ausgefällt wurde. Dementsprechend wurden 40 ccm des Pseudoglobulins mit 60 ccm 95prozentigen Alkohols, der mit Soda leicht alkalisch gemacht worden war, gefällt, der gebildete Niederschlag nach dem Absetzen rasch filtriert, gut abgepreſst und in 90 ccm Wasser digeriert, dem wenige Tropfen Sodalösung zugesetzt waren. Da

durch die Alkoholfällung der gröfste Teil des Eiweifses unlöslich geworden war, wurde eine relativ eiweifsarme Lösung erhalten, die, klar filtriert, einen Agglutinationswert von 500 aufwies, also, die Verdünnung mitberechnet, etwas mehr als ein Achtel des ursprünglichen Wirkungswertes von 1 : 8000 repräsentierte. Die Lösung enthielt nur Spuren koagulablen Eiweifses, gab schwache Biuretreaktion, schöne Millonsche Reaktion, keine Reaktion nach Molisch, sowie keine Schwefelbleiprobe, und liefs sich ohne Verlust durch Thonzellen filtrieren.

Es war auf diese Weise gelungen, den allergröfsten Teil der Eiweifskörper zu entfernen, freilich unter Verlusten an agglutinierender Substanz, die jedoch gegenüber der Entfernung der grofsen Masse der Eiweifskörper nicht allzu sehr ins Gewicht fallen. Da immerhin auch ein Teil der agglutinierenden Substanz durch Alkoholeinwirkung geschädigt wird, so kann nur ein geringer Teil des Verlustes an derselben aus der Entfernung der Eiweifskörper erklärt werden.

Immerhin zeigt der so gewonnene Körper noch Eiweifsreaktionen, die anscheinend in gleichem Mafse schwinden, in dem die physiologische Wirksamkeit abnimmt.

Wien, im Juli 1901.

Litteraturverzeichnis.

[1]) Ehrlich, Experimentelle Untersuchungen über Immunität. I. Über Ricin Nr. 32. II. Über Abrin Nr. 44. Deutsche mediz. Wochenschr. 1891. Ehrlich und Morgenroth, Über Hämolysine. Berliner klin. Wochenschr. 1899, 1900, 1901. Ehrlich, Schlufsbetrachtungen in Nothnagels Spezieller Path. und Therap. 8, 163.

[2]) Landsteiner, Zur Kenntnis der antifermentat., lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutes und der Lymphe. Zentralblatt für Bakt. und Paras. (I) 27, 357.

[3]) J. Morgenroth, Über den Antikörper des Labenzyms. Zentralbl. f. Bakt. u. Par. (I) 26, 349.

[4]) v. Dungern, Spezifisches Immunserum gegen Epithel. München. med. Wochenschr. Nr. 38, 1899. Beiträge zur Immunitätslehre (II). Daselbst Nr. 28, 1900.

[5]) F. Ransom, Die Lymphe nach intravenöser Injektion von Tetanustoxin und Tetanus-Antitoxin. Zeitschr. f. physiol. Chem. 29, 349. Weiteres über die Lymphe nach Injektion von Tetanusgift. Daselbst 29, 553.

[6]) J. Halban, Agglutinationsversuche mit mütterlichem und kindl. Blute. Wiener klin. Wochenschrift 13, 545 (1900).

[7]) P. Ehrlich, Über Immunität durch Vererbung und Säugung. Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt. 12 (1892).

[8]) Brieger und Ehrlich, Beiträge zur Kenntnis der Milch immunis. Tiere. Daselbst 13, 336.

[9]) Brieger und Cohn, Beiträge zur Konzentr. der gegen Wundstarrkrampf schützenden Substanz aus der Milch. Daselbst 15, 439.

[10]) Brieger und Boer, Über Antitoxine und Toxine. Daselbst 21, 259.

[11]) A. Wassermann, Über Konzentrierung des Diphtherieantitoxins aus der Milch immunisierter Tiere. Daselbst 18, 235.

[12]) H. Buchner, Weitere Untersuchungen über die bakterienfeindlichen und globuliciden Wirkungen des Blutserums. Archiv f. Hyg. 17, 112. Derselbe, Über den Einfluſs der Neutralsalze auf Serumalexine, Enzyme, Toxalbumine u. s. w. Daselbst 17, 138.

[13]) E. Freund und Sternberg, Über Darstellung des Heilkörpers aus dem Diphtherieheilserum. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 31, 429.

[14]) W. Seng: Über die qualitativen und quantitativen Verhältnisse der Eiweiſskörper im Diphtherieheilserum. Daselbst 31, 513.

[15]) H. Winterberg, Untersuchungen über das Typhusagglutinin und die agglutinirbare Substanz der Typhusbacillen. Daselbst 32, 375.

[16]) E. Marcus, Über in Wasser lösliches Serumglobulin. Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 559.

[17]) G. Kauder, Zur Kenntnis der Eiweiſskörper des Blutserums. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmak. 20, 411.

[18]) J. Pohl, Bemerkungen über künstlich dargestellte Eiweiſsnukleine. Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 294.

[19]) E. P. Pick, Ein neues Verfahren zur Trennung von Albumosen und Peptonen. Daselbst 24, 246.

[20]) E. Zunz, Die fraktionierte Abscheidung der peptischen Verdauungsprot. mittels Zinksulfat. Daselbst 27, 219.

[21]) W. R. Raudnitz, Über sogenannte Fermentreaktionen der Milch. Zentralbl. f. Physiol. 12, 790.

[22]) M. Jakoby, Über das Aldehyde oxydierende Ferment der Leber und Nebenniere. Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 135. Derselbe, Über die chemische Natur des Ricins. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 46, 28.

[23]) Ide und Lemaire, Archives internat. de pharmacodyn. et de thér. Vol. VI, p. 1899.

[24]) Fuld und Spiro, Über labende und labhemmende Wirkung des Blutes. Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 132.

[25]) Dieudonné, Ergebnisse der Sammelforschung über das Diphtherieheilserum. Arbeiten aus dem kaiserl. Gesundheitsamte 13, 293 (1897).

[26]) Smirnow, Archives sciences biol. publ. par l'Inst. Impér. de méd. exp. à St. Pétersbourg. T. IV, 1895; zit. nach Dieudonné.

[27]) Belfanti und Carbone, Contributo alla conoscenza dell' antitossina difter. Archivio par le scienze med. Vol. 22, Nr. 2; zit. nach Zentralbl. f. Bakter. I, 23, 1898.

[28]) T. G. Brodie, A preliminary report of some experim. upon the chemistry of diphtheria antitoxin. The Journal of Pathol. and Bact., juin 1897, p. 460.

[29]) J. P. Atkinson, Journ. of exper. medicine 4, 649.

[30]) W. Reye, Über den Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Diss., Strafsburg 1898.

[30a]) G. Tizzoni, Über experimentelle Immunität gegen Tetanus. Intern. Beiträge zur wissenschaftl. Medizin. Festschrift für Virchow. Bd. III, S. 31 (1891).

[31]) W. Pauli, Die physikalischen Zustandsänderungen der Eiweifskörper. Arch. f. Physiol. 78, 315.

[32]) P. Ehrlich, Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen. Klin. Jahrbuch 6 (1897).

[33]) R. Pfeiffer, Die Differentialdiagnose der Vibrionen der Cholera mit Hilfe der Immunisierung. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 19 (1895). Derselbe, Weitere Untersuchung über das Wesen der Choleraimmunität und über spezielle baktericide Stoffe. Daselbst 18.

[34]) Pfeiffer und Proskauer, Beiträge zur Kenntnis der speziellen wirksamen Körper im Blutserum von choleraimmunen Tieren. Zentralbl. f. Bakt. 19, 191 (1896).

[35]) Gruber und Durham, Eine neue Methode zur raschen Erkennung des Choleravibrio und des Typhusbacillus. Münch. med. Wochenschr. 1896; ferner Gruber, Wiener klin. Wochenschr. Nr. 11 u. 12, 1896.

[36]) Widal und Sicard, Étude sur le sérodiagnostic et sur la réaction agglutinante chez les typhiques. Annales de l'Inst. Pasteur 11, 353.

[37]) A. Gürber, Die Salze des Blutes. Verhandl. d. physik.-med. Ges. zu Würzburg 28 (1894).

[38]) A. Gürber, Zur Kenntnis der Chemie und Physiologie des Blutserums. Beiträge zur Physiologie. Festschrift für A. Fick, 1899.

[39]) J. Bordet, Le mécanisme de l'agglutination. Annales de l'Inst. Pasteur 13, 225. Derselbe, Sur l'agglutination et la dissolution des globules rouges par le sérum d'animaux injectés de sang défibriné. Daselbst 1898, S. 688.

[40]) E. Zunz, De la séparation des albuminoides par l'emploi de sels. Annales publ. par la Société royale des sciences médic. et nat. Bruxelles 9, 2—3 (1900).

[41]) E. Duclaux, Sur la coagulation du sulfate de quinine. Annales de l'Inst. Past. 6, 657. Derselbe, Traité de microbiologie 2, 627 (1899).

[42]) Dzierzgowski, Archives des scienc. biol. publ. par l'Inst. Impér. de méd. exp. à St. Pétersb. 7, 337.

[43]) G. M. Malkoff, Beitrag zur Frage der Agglutination der roten Blutkörperchen. Deutsche med. Wochenschr. Nr. 14, 1900.

[44]) Behring und Kitashima, Berliner klin. Wochenschr. 1901.

[45]) A. Wassermann, Experimentelle Beiträge zur Kenntnis der natürlichen und künstlichen Immunität. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 37 (1901).

[46]) Emmerich und Tsuboi, Über die Natur der Schutz- und Heilsubstanz des Blutes. Verhandl. d. XI. Kongr. f. innere Medizin zu Leipzig, 1892.

[48]) P. Nolf, Contribution à l'étude des sérums antihématiques. Ann. de l'Inst. Past. 14, 302.

[49]) M. Ide, Über Antikörper gegen chemisch reine Eiweifsstoffe. Vorl. Mitth. Fortschr. d. Medizin 1901, S. 234.

[50]) R. Kraus, Über spezielle Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera-, Typhus- und Pestbouillonkulturen, erzeugt durch homologes Serum. Wien. klin. Wochenschr. 1897, Nr. 18 u. 32.

[51]) J. Bordet, Annales de l'Inst. Pasteur 1896, avril, pag. 208. Van de Velde, Académie royale de médecine de Belgique 27 mars 1897; zit. nach Nicolle.

[52]) Ch. Nicolle, Recherches sur la substance agglutinée. Annales de l'Inst. Past. 12, 161.

[53]) Salkowski, Zeitschr. f. klin. Medizin, Supplem. 1891.

[54]) M. Hahn, Immunisierung und Heilversuche mit den plasmatischen Zellsäften von Bakterien. Münch. med. Wochenschr. 1897, S. 1344; daselbst auch Buchner. Ferner Emmerich und Löw, Bakteriolyt. Enzyme u. s. w. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 31, 68.

[55]) L. Brieger, Weitere Erfahrungen über Bakteriengifte. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 19, 101.

[56]) Malvoz, Annales de l'Inst. Past. 1897, juillet, p. 582.

[57]) O. Bail, Untersuchungen über die Agglutination von Typhusbakterien. Prager med. Wochenschr. Nr. 7, Nr. 12, 1901.

[58]) Franz Müller, Beiträge zur Toxikologie des Ricins. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 42, 302.

[59]) H. E. Durham, Some theoretical considerations upon the nature of agglutinins, together with further observations upon bacillus typhi-abdom. etc. The journal of exper. medicine 5, 353, Nr. 4. Siehe daselbst auch Walker 5, Nr. 5, New York 1901.

[60]) Th. Tchistowitsch, Études sur l'immunisation contre le sérum d'anguilles. Ann. de l'Inst. Past. 13, 406.

[61]) M. Jacoby, Über Ricinimmunität. Diese Beiträge 1, 51.

[62]) E. Levy und H. Bruns, Beiträge zur Lehre der Agglutination. Berl. klin. Wochenschr. Nr. 23, 1897.

[63]) Paul Müller, Über Antihämolysine. Zentralbl. f. Bakt. u. Par. I, Nr. 5, 1901; 129, 860 (1901).

[64]) Pick und Spiro, Über gerinnungshemmende Agentien im Organismus höherer Wirbeltiere. Zeitschr. f. phys. Chem. 31, 235.

[65]) J. Levy und Gissler, Untersuchungen über Typhusserum. Münch. med. Wochenschr. 1897, S. 1435.

[66]) Nencki und Sieber, Beiträge zur Kenntnis des Magensaftes und der chemischen Zusammensetzung der Enzyme. Zeitschr. f. physiol. Chemie, 32, 291.

[67]) Walter Myers, Über Immunität gegen Proteide. Zentralbl. f. Bakt. u. Par. I, 28, 237.

[68]) J. Jacobson, Untersuchungen über lösliche Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chem. 16, 340.

[69]) K. Spiro, Über Beeinflussung der Eiweifskoagulation durch stickstoffhaltige Substanzen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 182.

[70]) Blum, Über eine neue Klasse von Verbindungen der Eiweifskörper. Daselbst 22, 127.

[71]) Leo Schwarz, Über Verbindungen der Eiweifskörper mit Aldehyden. Daselbst 31, 460.

[72]) C. Levaditi, Comptes rend. de soc. biolog. 51, 757.

[73]) A. Joos, Untersuchungen über den Mechanismus der Agglutination. Zeitschr. f. Hyg. und Inf. 36, 422.

[74]) E. Duclaux, Traité de microbiologie, t. II, p. 709.

[75]) Elfstrand, Über Blutkörperchen agglutinierende Eiweifse. Görbersdorfer Veröffentl. I, 1898.

[76]) Hahn und Trommsdorf, Über Agglutinine. Münch. med. Wochenschrift 1900, S. 413.

[77]) Alex. Radzievsky, Beitrag zur Kenntnis des Bakterium coli. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 34, 430.

[78]) H. Conradi, Diese Beiträge 1, 159.

[79]) R. Kretz, Beiträge zur Kenntnis der Agglutination der Bakterien. Jahrbuch der Wiener k. k. Krankenanstalten 6, 303 (1897).

[80]) Kurajeff, diese Beiträge 1, 127.

XXVIII.

Über die Bildung von Phenol und Indoxyl im intermediären Stoffwechsel und deren Beziehung zur Glykuronsäureausscheidung.

Von **Carl Lewin**, prakt. Arzt.

(Aus dem Laboratorium der I. medizinischen Klinik zu Berlin. Direktor: Geheimer Medizinalrat Prof. Dr. von Leyden.)

1.

Dafs Phenol (die kurze Bezeichnung „Phenol" gilt hier, wie vielfach in der Litteratur, für die Summe der bei Fäulnis auftretenden, im Harn ausgeschiedenen Homologen des Phenols, unter denen das Parakresol bekanntlich überwiegt) ein Produkt der Darmfäulnis ist und lediglich bei dieser entsteht, ist zu einem feststehenden Satze der Physiologie geworden. Nachdem Städeler zuerst das Vorkommen von Phenol im Rinder- und Pferdeharn beobachtet hatte, konnten Landolt, Lieben, F. Hoppe-Seyler, Buliginsky, J. Munk u. a. dasselbe im normalen menschlichen Urin nachweisen, und Salkowski*) machte zuerst darauf aufmerksam, dafs in Fällen von Ileus und ähnlichen Darmerkrankungen eine abnorm hohe Phenolausscheidung zu bemerken ist.

Die Frage der Herkunft des Phenols schien durch die Arbeiten von Baumann, Brieger, Salkowski u. a. völlig gelöst.

F. Hoppe-Seyler**) sprach zuerst die Vermutung aus, dafs Phenol und Indikan derselben Ursache ihre Entstehung verdanken,

*) Salkowski, Zentralbl. für die mediz. Wiss. 1876, S. 818; Virchows Archiv, 73, 409; Berichte der deutsch. chem. Ges. 9, 595 und 10, 842 bis 844.

**) Hoppe-Seyler, Pflügers Archiv 5, 470 bis 480.

und Baumann*) konnte zeigen, dafs bei der Fäulnis der Eiweifsstoffe Phenol entsteht und dafs es im Harn als Ätherschwefelsäure ausgeschieden wird. Gleichzeitig teilte Salkowski seine Erfahrungen über das Auftreten von Phenol nach Darmunterbindungen mit und Brieger**) bewies, dafs die Darmfäulnis dieselben Produkte liefert wie die künstliche Pankreasfäulnis. Danach war es klar, dafs das Phenol im Harn aus der Darmfäulnis stammt.

Nicht ganz so unbestritten ist die Frage der Herkunft des Indikans gelöst.

Bekanntlich verdanken wir unsere Kenntnis über die Indikanausscheidung zum gröfsten Teil den Untersuchungen Jaffés. Nachdem von Heller, Schenck und Hoppe-Seyler das Auftreten von indigobildenden Substanzen im Harn nachgewiesen war, konnte Jaffé***) zeigen, dafs nach subkutanen Injektionen von Indol im Urin reichlich Indikan auftrat. Dasselbe sah er bei Menschen, die an einer Unwegsamkeit des Dünndarms litten, und bei Tieren, denen er den Dünndarm unterband. Diese Untersuchungen Jaffés wurden durch Nencki und Maçon†) bestätigt. Nigeller††) zeigte, dafs die Umwandlung des Indols in Indikan nicht im Darm vor sich geht, und Baumann und Brieger†††) fanden, dafs Indol in Indoxylschwefelsäure übergeführt wird, Indikan somit auch eine Ätherschwefelsäure ist. Da nun Indol, wie schon Kühne§) als wahrscheinlich hingestellt, Nencki§§) aber zur Gewifsheit erhoben hatte, bei der Pankreasverdauung im Darm entsteht, so schlossen diese Forscher alle, dafs auch Indikan der Darmfäulnis entspringt.

Allein bereits Jaffé meinte, dafs Indikan auch im Organismus selbst sich bilden könne. Dazu mufste Voraussetzung sein,

---

*) Baumann, Zeitschr. für phys. Chemie **1**, 60; Ber. d. deutsch. chem. Ges. **10**, 685.

) Brieger, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **10, 1027; Journ. f. prakt. Chem., N. F. **17**, 124—138; Zeitschr. f. phys. Chem. **3**, 147.

***) Jaffé, Pflügers Archiv 1870, S. 449; Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1872. S. 1, 31 u. 32; Virchows Archiv **70**, 77—111.

†) Maçon, Arch. d. phys. norm. et pathol. Paris 1874.

††) Nigeller, Arch. f. exp. Path. und Pharm.

†††) Baumann und Brieger, Zeitschr. f. phys. Chem. **3**, 254; Baumann, daselbst **1**, 60 und Pflügers Arch. **3**, 291.

§) Kühne, Virchows Arch. **39**, 130; Ber. d. deutsch. chem. Ges. **8**, 206.

§§) Nencki, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **8**, 336 und 722 und **10**, 299; Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1878, Nr. 34.

dafs die Vorstufe des Indikans, das Indol, auch ohne Anwesenheit von Fäulniserregern entstehen kann. So giebt auch Hoppe-Seyler*) an, dafs Fibrin sich ohne Mitwirkung von Bakterien unter Indolbildung zersetzt. Kühne und Nencki**) stellten Indol aus Eiweifs durch Schmelzen mit Kali, Koukol-Jasnopolski***) durch Erhitzen von Eiweifs mit Wasser auf 180° dar. Zwar leugneten Kühne und Nencki die Möglichkeit, dafs Indol im Organismus ohne Fäulnis entstehe. Hoppe-Seyler hingegen hielt immer die Meinung aufrecht, dafs dies sowohl für Indol wie auch alle anderen aromatischen Fäulnisprodukte sehr wahrscheinlich sei. Auch Salkowski†) und von Jaksch vertraten diese Ansicht, für die zumal eine Reihe von klinischen Thatsachen ins Gewicht fiel. Zunächst die von Salkowski, Jaffé u. a. beobachtete Indikanurie bei hungernden Tieren und Menschen. Freilich erklärten Nencki††) und nach ihm Friedrich Müller†††) diese Thatsache damit, dafs die Darmsekrete der Fäulnis unterlägen, somit Indol und Phenol davon herzuleiten seien, und auch Beckmann§) meint, dafs eine andere Quelle für die Indolbildung aufser der Darmfäulnis nirgends mit Sicherheit nachgewiesen sei.

Dagegen nahm Henniga§§) an, dafs die Bildung der indigobildenden Substanzen zum Teil auf vermehrten Zerfall von Organeiweifs zurückgeführt werden müsse, und Senator§§§) hat in einer ganzen Reihe von Inanitions- und Konsumtionszuständen vermehrte Indikanausscheidung gesehen. Ebenso fand er Indikanurie bei einer sehr grofsen Zahl von Erkrankungen des Kindesalters, die, wie er ausdrücklich hervorhebt, unmöglich auf Affektionen des Darmkanals bezogen werden können. Ähnliche Beobachtungen machten Rosenbach†*) und Concetti†**). Der letztere hält im besonderen Indolbildung in in den Organen infolge eines durch toxische Einflüsse hervorgerufenen Eiweifszerfalls für sehr wahrscheinlich.

---

*) Hoppe-Seyler, Tübinger med. Untersuchungen S. 365.

**) l. c.

***) Pflügers Archiv **12**, 78.

†) Salkowski, Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1878, Nr. 31 und 42 und Ber. d. deutsch. chem. Ges. **9**, 138.

††) Nencki, Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1878, Nr. 34.

†††) Friedrich Müller, Berl. klin. Wochenschr. 1887, Nr. 4.

§) Beckmann, St. Petersburger med. Woch. 1894, Nr. 28 u. 29.

§§) Henniga, Deutsches Archiv f. kl. Med. **23**, 271—287.

§§§) Senator, Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1877, Nr. 20, 21 u. 22.

†*) und †**) zitiert bei Maly, Jahresber. **23**, 595, resp. **28**, 702.

Ist demnach in diesen Arbeiten die Bildung von Indol oder einer anderen Vorstufe des Indoxyls im Organismus schon vermutet, so wird sie noch wahrscheinlicher durch die Untersuchungen von Harnack*) über Indikanurie nach Oxalsäurevergiftung. Ich sehe an dieser Stelle ab von den Beziehungen zwischen Oxalurie, Indikanurie und Diabetes, die Harnack als wahrscheinlich hinstellt, und gehe lediglich auf das ein, was für die Indolbildung aus dem Organeiweifs von Wichtigkeit erscheint.

Senator hat in seiner schon zitierten Arbeit in vielen Fällen von Indikanurie eine starke Vermehrung des Kalkes im Harn gesehen. Auch bei Oxalsäurevergiftung ist die Kalkausscheidung nach Caspary**) und Zuntz vermehrt. Es kann also zwischen Oxalsäurewirkung und Indikanurie ein Zusammenhang bestehen. Harnack konnte nun bei seinen in Gemeinschaft mit Frl. von der Leyen vorgenommenen Untersuchungen zeigen, dafs nach subkutaner Injektion von 0,1 g oxalsauren Natrons eine starke Indikanurie bei Hunden sich erzielen läfst. Zu diesen Untersuchungen veranlafste ihn die Beobachtung, dafs in einem Falle von Oxalsäurevergiftung beim Menschen kolossale Mengen von Indikan ausgeschieden wurden.

Harnack schliefst mit Recht, dafs so geringe Dosen von Oxalsäure unmöglich irgend eine Darmwirkung hervorrufen können, und er hält es für wahrscheinlich, dafs die Indikanurie auf einer Stoffwechselstörung beruht, welche die Oxalsäure im Organismus hervorgerufen hat. Es mufs dabei Indol oder eine andere Vorstufe des Indikans durch abnorme Zersetzungsvorgänge im Körpereiweifs entstanden sein.

Die Frage, ob die bei der Darmfäulnis entstehenden Körper, vor allem Indol und Phenol, auch beim Zerfall des Organeiweifses sich bilden können, ist durch diese Untersuchungen Harnacks von neuem angeregt worden, und sie erhält eine spezielle Bedeutung im Hinblick auf die Verhältnisse bei der Glykuronsäureausscheidung.

Bekanntlich hat Baumann zuerst nachgewiesen, dafs Phenol und Indoxyl als Ätherschwefelsäuren im Harn erscheinen. Allein er fand noch eine zweite „phenolbildende“ Substanz im Urin, ebenso wie er eine zweite „indigobildende“ Substanz entdeckte, die, wie er angiebt, sich sehr leicht zersetzt.

---

*) Harnack, Zeitschr. f. phys. Chem. 1900, Heft 3, S. 205—221.

**) Caspary, Dissert., Berlin 1895, S. 8.

Heute wissen wir durch die Untersuchungen von Külz, Schmiedeberg, Thierfelder u. a., dafs diese zweite Substanz eine gepaarte Glykuronsäure ist.

Nun nimmt Paul Mayer*) an, dafs die Glykuronsäureausscheidung in vielen Fällen ein Zeichen mangelhafter Oxydation des im Körper gebildeten Traubenzuckers ist, dafs also die betreffenden Individuen die Fähigkeit verloren haben, die Verbrennung des Zuckers bis zum völligen Abbau des Moleküls durchzuführen. So erscheinen denn auch bei Diabetikern leicht grofse Mengen von gepaarten Glykuronsäuren und in diesem Sinne fafst P. Mayer auch die nach zahlreichen Vergiftungen auftretende reichliche Glykuronsäureausscheidung auf. Er meint, dafs auch hier die Oxydationskraft des Organismus gestört sei, so dafs die Verbrennung des Zuckers nur bis zur Glykuronsäure vor sich gehe, dann aber gehemmt sei. Als Beweis hierfür führt er hauptsächlich Untersuchungen an, die immer dann vermehrte Glykuronsäureausscheidung ergaben, wenn durch Zirkulations- resp. Respirationsstörungen ein Sauerstoffmangel im Blut auftrat.

Nach dieser Ansicht wäre die Bildung der Glykuronsäure das primäre, die Paarung mit aromatischen Substanzen und anderen Körpern, die als gepaarte Glykuronsäure ausgeschieden werden, das sekundäre Moment. Diese Auffassung mag in einer Reihe von Fällen eine richtige sein. Allein es ist auch möglich, bei einer vermehrten Glykuronsäureausscheidung als Ursache eine vermehrte Bildung von Substanzen anzunehmen, die sich entweder, wie Schmiedeberg und Meyer**) vermuten, mit der aus dem Traubenzucker gebildeten Glykuronsäure paaren und sie so vor weiterer Verbrennung schützen, oder die sich, wie Fischer und Piloty***) anzunehmen geneigt sind, zunächst mit dem Traubenzucker verbinden und dann erst durch Oxydation in die gepaarte Glykuronsäure übergehen.

Woher aber sollten diese Substanzen stammen? Wir wissen durch Paul Mayer und Neuberg u. a., dafs der gröfste Teil der im Urin ausgeschiedenen Glykuronsäure an Phenol, zum kleinern

---

*) Paul Mayer, Berl. klin. Wochenschr. 1899, Nr. 27 u. 28; Deutsche med. Wochenschr. 1901 und Verhandlungen des Kongresses für innere Medizin 1901.

) Schmiedeberg und Meyer, Zeitschr. für physiol. Chem. **3, 422.

***) Fischer und Piloty, Ber. d. deutsch. chem. Gesellschaft **24**, 522 und **26**, 2403—2405.

Teil an Indoxyl und Skatoxyl gebunden ist. Phenol, Indol, Skatol u. s. w. sind nun Produkte, die bei der Darmfäulnis entstehen. In sehr vielen Fällen aber, wo wir eine Vermehrung der Glykuronsäure sehen, ist eine vermehrte Darmfäulnis nicht anzunehmen, insbesondere nicht bei einer Reihe von Vergiftungen oder bei Diabetesfällen, die eine Vermehrung der in jedem normalen Harn vorhandenen Glykuronsäure zeigen.

Ganz anders aber würden sich diese Verhältnisse darstellen, wenn wir nachweisen könnten, dafs bei diesen Fällen auch aufserhalb des Darmkanals sich Substanzen bilden können, die sich erfahrungsgemäfs mit Glykuronsäure paaren. Das sind für den menschlichen Urin hauptsächlich Phenol und Indoxyl.

Schon zu Anfang dieses Jahres, in der Berliner physiologischen Gesellschaft, wandte sich Blumenthal gegen die Auffassung, dafs die Glykuronsäure bei der Entstehung der gepaarten Glykuronsäuren das Primäre sei. Er hielt es für wahrscheinlich, dafs in vielen solchen Fällen eine abnorme Bildung von Phenol und Indol im Organismus aus Eiweifs erfolge, wodurch die Glykuronsäurevermehrung zwanglos zu erklären sei, zumal ja aufserdem noch keineswegs bewiesen sei, dafs die Glykuronsäure nur durch Oxydation von Traubenzucker und nicht auch aus Eiweifs entstehen könne.

Für diese Auffassung war Vorbedingung, dafs Phenol und Indoxylbildung auch ohne Bakterien im Organismus stattfinden könne, und ich habe es deshalb unternommen, zu prüfen, ob eine Bildung von Phenol und Indoxyl auch aufserhalb des Darmkanals und zwar unter Ausschlufs der Bakterienwirkung stattfinden kann, d. h. ob Indoxyl und Phenol durch nicht bakteritischen Eiweifszerfall im Tierkörper entsteht, und ob dabei gleichzeitig eine vermehrte Bildung von Glykuronsäure stattfindet.

Die Untersuchungen habe ich zum Teil an Menschen, zum gröfsten Teil jedoch an Kaninchen angestellt. Da ich nicht nur die Bildung von Phenol und Indoxyl, sondern auch deren Beziehungen zur Glykuronsäureausscheidung prüfen wollte, so habe ich meine Versuche bei der Vergiftung mit Phloridzin angestellt, weil ja nach v. Mering u. a. hierbei Zustände geschaffen werden, die mit dem Diabetes eine gewisse Analogie darbieten.

Wir wissen durch die Untersuchungen von v. Mering*)

*) v. Mering, Zeitschr. f. klin. Med. 14, 405 und 16.

Moritz und Praufsnitz*), Rost**) u. a., dafs die bei der Phloridzinvergiftung auftretende Glykosurie zu einem grofsen Teil auf den Zerfall von Körpereiweifs zurückzuführen ist.

Es war also, falls Phenol und Indoxyl durch Eiweifszerfall entstehen können, anzunehmen, dafs ein Mittel wie Phloridzin, welches einen starken Eiweifszerfall bewirkt, ebenfalls Phenol- und Indoxylvermehrung hervorrufen würde. Hierbei hielt ich es für richtig, nur mäfsig ernährte Tiere zu wählen und sie auch in einer gewissen Unterernährung zu erhalten, weil dann bei der vorhandenen geringen Glykogenmenge der Eiweifszerfall durch Phloridzinwirkung deutlicher zu tage tritt.

Dafs eine solche Phenol- resp. Indoxylvermehrung auf eine vermehrte Darmfäulnis zurückzuführen wäre, hielt ich für ausgeschlossen. Denn die subkutane Injektion von 0,25 g Phloridzin — und über diese Dosis bin ich bei Menschen nicht hinausgegangen — kann unmöglich die Darmfäulnis so beeinflussen, dafs irgend welche nennenswerten Folgen sichtbar werden. Wir wissen, dafs die Spaltungsprodukte des Phloridzins durch die Nieren ausgeschieden werden, und es kann nur ein ganz geringer Teil davon in den Darm gelangt sein. Ich konnte mich zudem durch einen direkten Versuch überzeugen, dafs Phloridzin auf die Darmfäulnis nicht wirkt. Denn bei einer Dosis von 7 g per os, die in einem Versuch beim Menschen angewandt wurde, habe ich in der Ausscheidung von Phenol und Indikan keine Steigerung gesehen. Dabei war gleichzeitig auch keine Glykosurie aufgetreten. Dafs Phenole selbst aus Phloridzin in irgend erheblicher Menge im Organismus entstehen, ist aus verschiedenen Gründen nicht anzunehmen.

2. Einflufs der Phloridzinzufuhr auf die Phenol-, Indoxyl- und Glykuronsäureausscheidung beim Kaninchen.

Zunächst will ich nun über einige Versuche berichten, die ich bei Kaninchen anstellte.

Peurosch***) hatte seiner Zeit mitgeteilt, dafs bei Kaninchen nur durch Fütterung mit Fleisch oder frischem Gras, niemals aber durch andere Nahrungszufuhr Indikanausscheidung zu bewirken ist. Auch Rosin†) fand im Kaninchenharn niemals Indigorot oder Indigblau. Harnack konnte bei seinen Oxalsäureversuchen beim Kaninchen nur in einem Falle Indikanurie erzeugen. Dafs diese Tiere aber nicht unfähig sind, Indikan zu bilden, das hat

*) Moritz und Praufsnitz, Zeitschr. f. Biologie 27 (N. F.), 93 u. s. w.
**) Rost, Arbeiten aus dem Kais. Gesundheitsamt 15, 2.
***) Peurosch, Diss.. Königsberg 1877.
†) Rosin, Virchows Archiv 123, 519.

G. Hoppe-Seyler*) nachgewiesen, der nach Fütterung von Orthonitrophenylpropionsäure im Harn von Kaninchen stets Indikan auftreten sah.

Die Versuche wurden zunächst so angestellt, dafs ich Kaninchen eine bestimmte nicht sehr reichliche Nahrung zuführte und dabei die Phenol-, Indikan- und Glykuronsäureausscheidung beobachtete. Indikan und Glykuronsäure wurden täglich untersucht, dagegen habe ich in den ersten zwei Versuchen zur Phenolbestimmung den Urin von mehreren Tagen genommen, da die Urinmenge für eine tägliche Bestimmung nicht ausreichte. Bei allen anderen Versuchen machte ich tägliche Phenolbestimmungen. Nunmehr erhielten die Tiere — bei gleicher Nahrung — eine bestimmte Dosis Phloridzin subkutan injiziert. Der Urin wurde dabei nach denselben Grundsätzen wie in der Vorperiode untersucht, und es schlofs sich hieran eine Nachperiode.

Bestimmt wurde Phenol nach der Methode von Kofsler und Penny**).

200 ccm Harn — war nicht so viel Urin vorhanden, so wurde er entsprechend verdünnt — wurden bei alkalischer Reaktion auf etwa ein Fünftel des Volumens eingedampft, auf 200 ccm aufgefüllt, mit 10 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt und vier- bis fünfmal unter jedesmaliger Ergänzung zur Hälfte abdestilliert. Die Destillate wurden mit Calciumkarbonat neutralisiert und sodann die Flüssigkeit vom Calciumkarbonat abdestilliert. Das in Flaschen mit eingeschliffenem Stopfen aufgefangene Destillat wird mit Zehntel-Normal-NaOH stark alkalisch gemacht, auf dem Wasserbade erwärmt, dann sofort Zehntel-Normaljodlösung zugesetzt (10 bis 15 ccm mehr als man Zehntel-Normal-NaOH gebraucht hatte). Die Flaschen werden geschlossen und bis zum Erkalten stehen gelassen. Nunmehr wird mit HCl angesäuert und mit Zehntel-Normalthiosulfatlösung titriert (als Titer dient Stärkelösung). Die erhaltene Zahl wurde auf Phenol berechnet (1 ccm Jodlösung = 1,567 mg Phenol).

Waren jedoch im Harn Kohlehydrate, so wurde nach der Modifikation von Neuberg***) verfahren.

Die vom Calciumkarbonat abdestillierten Flüssigkeiten wurden in einen Literkolben gebracht und mit einem Gemenge von 1 g Ätznatron und 6 g festem Bleizucker versetzt. Diese Flüssigkeit wurde sodann auf kochendem Wasserbade $^1/_4$ Stunde lang erhitzt, bis das Destillat keine Aldehydreaktion mehr gab (was nach 15 Minuten stets der Fall war). Sodann wurde mit stark verdünnter Schwefelsäure angesäuert

*) G. Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. phys. Chemie 7, 420.

**) Kofsler und Penny, Zeitschr. f. phys. Chem. 17, 117—139.

***) Neuberg, daselbst 27, 423.

und die Flüssigkeit unter zweimaliger Ergänzung abdestilliert. Sodann erfolgte die Titrierung wie vorher.

Indikan wurde nach Jaffé und Obermeyer qualitativ bestimmt.

Zur Erkennung der Glykuronsäure diente die von Salkowski und Blumenthal*) angegebene Orcinreaktion, wobei der Harn jedoch etwas länger im Sieden erhalten wurde, als dies bei der Anstellung der Reaktion auf Pentosen der Fall ist. Auch wurde die Drehung des Harns im Polarisationsapparat bestimmt.

In den Fällen, wo ich Stickstoffbestimmungen machte, geschah dies nach der Methode von Kjeldahl.

Versuch I.

Zwei Kaninchen. Tägliche Nahrung = 200 g Mohrrüben + 100 g Brot. Der Harn beider Tiere wird in einem Gefäfs aufgefangen.

Datum	Trommer	Polarisation vor Vergärung	Polarisation nach Vergärung	Orcin	Indikan	Phenol	Bemerkungen
27. März	negativ	Keine Dreh.	—	negativ	negativ	Auf d. Tag ber. wurde durchschn. ausgeschieden: 6,91 mg Phenol	Vorperiode
28 „	„	„ „	—	„	„		
29. „	„	„ „	—	„	„		
30. „	„	„ „	—	„	+ Spur		
31. „	„	Spur links	—	„	negativ		
1. April	+	0,75 Proz. r.	—	mifsglückt	+ stark	Tägliche Phenolmenge 16,35 mg	Pro Kaninchen tägl. 0,8 g Phloridzin subk.
2. „	+	4 „ r.	0,5 Proz. l.	+	+ „		
3. „	+	4,5 „ r.	0,25 „ l.	+	+ „		
4. „	+	3 „ r.	0,85 „ l.	+	+ mittel		
5. „	+	0,75 „ r.	0,8 „ l.	+	+ stark	ist mifsglückt	Nachperiode
6. „	—	0,2 „ r.	—	+	+ schwach		

Der Versuch mufste abgebrochen werden, da ein Kaninchen starb.

Es zeigt sich in der Phloridzinperiode eine starke Vermehrung des Indikans und Phenols. Zugleich sehen wir die Orcin-Salzsäurereaktion, die in der Vorperiode nicht vorhanden war, während der ganzen Zeit der Phenol- resp. Indikanurie andauernd positiv ausfallen. Aufserdem war nach Vergärung Linksdrehung vorhanden. Durch diese Reaktionen erkennen wir, dafs es sich um Glykuronsäure handelt. Die Indikanausscheidung wurde schätzungsweise nach der Farbenintensität als schwach, mittel oder stark bezeichnet.

Die Glykuronsäureausscheidung dauerte noch in den beiden Tagen der Nachperiode an, wobei Indikan ebenfalls vorhanden war.

*) F. Blumenthal, Zeitschr. f. klin. Med. 37, 415. E. Salkowski, Zeitschr. f. phys. Chemie 27, 525.

Versuch II.

Zwei Kaninchen. Hier wurden nicht tägliche Untersuchungen gemacht, sondern der Urin wurde an den einzelnen Tagen gesammelt und die Gesamtmenge in den einzelnen Perioden untersucht.

Die tägliche Nahrungsaufnahme war: 200 g Mohrrüben und 150 g Brot.

Datum	Trommer	Polarisation vor Vergärung Proz.	Polarisation nach Vergärung Proz.	Orcin	Indikan	Phenol Pro Tag	N. Pro Tag	Bemerkungen
Urin v. drei Tagen . .	+	0,75 r.	mifsglückt	+	+ stark	7,83 mg	0,66 g	Vorperiode
Desgl.	+	2,5 r.	0,2 l.	+	+ „	14,85 „	0,903 „	Pro Tag jedes Kaninchen 0,5 g Phloridzin subkutan
„	+	0,2 r.	0,3 l.	+	+ „	10,20 „	nicht bestimmt	I. Nachperiode
„	+	0,2 r	—	+	+ mittel	11,5 „	desgl.	II. „

Es handelt sich hier also um Kaninchen, die sowohl in der Vor- als auch in den Nachperioden gleichzeitig Glykosurie und starke Indikanausscheidung zeigen. Auch bei diesem Versuch sehen wir in jedem Falle neben der Indikanurie Glykuronsäureausscheidung. In Rücksicht darauf, dafs Kaninchen, wie übereinstimmend von allen Forschern gesagt wird, nur sehr selten Indikan ausscheiden, ist es doppelt auffällig, dafs eine solche Indikanurie gerade mit Glykosurie zusammenfällt. Es ist dies ein Befund, der uns noch weiterhin beschäftigen wird.

Die Steigerung der Phenolmenge ist in diesem Falle vorhanden, jedoch nicht sehr bedeutend. Die gegen die Vorperiode gesteigerte Phenolausscheidung in den beiden Nachperioden läfst sich vielleicht aus den Stoffwechselstörungen erklären, den diese Kaninchen auch ohne Phloridzininjektion zeigen.

Der Stickstoffgehalt in der Phloridzinperiode ist gegen die Vorperiode ebenfalls vermehrt, in den beiden Nachperioden unterblieb die Stickstoffbestimmung.

Versuch III.

Drei Kaninchen. Tägliche Nahrung bestand in 200 g Kohl und 100 g Brot. Es wurde sowohl Phenol als auch Indikan und Glykuronsäure täglich untersucht.

Datum	Trommer	Polarisation vor Vergärung Proz.	Polarisation nach Vergärung Proz.	Orcin	Indikan	Phenol mg	Durchschnitt mg	Bemerkungen
17. Mai	+	6,25 r.	—	+	+ stark	31,34	34	Vorperiode
18. „	+	0,4 r.	—	+	+ „	29,20		
19. „	+	mifsglückt		+	+ „	42,82		
20. „	+	4,4 r.	0,45 l.	+	+ sehr stark	33,29	48	Täglich jedes Kaninchen 0,5 g Phloridzin subkutan
21. „	+	2,0 r.	0,55 l.	+	+ desgl.	54,63		
22. „	+	4,0 r.	0,45 l.	+	+ „	55,47		
23. „	+	0,25 r.	0,15 l.	+	+ stark	52,99	39	Nachperiode
24. „	+	0,4 r.	—	+	+ „	26,07		
25. „	+	0,2 r.	—	+	+ „	41,0		

Was bei diesem Versuche wiederum auffällt, ist eine andauernde Glykosurie, die mit Indikanurie einhergeht. Ich vermute, dafs sowohl in diesem wie auch in dem vorhergehenden Falle die Nahrungsaufnahme keine genügende war, so dafs diese Stoffwechselstörungen vielleicht dadurch zu erklären sind, zumal wir ja wissen, dafs im Hungerzustand sowohl bei Menschen als auch bei Tieren zuweilen Zucker ausgeschieden wird. Auch bei diesem Versuche zeigt sich ferner die Orcin-Salzsäurereaktion an allen Tagen positiv, wenn es auch nicht immer gelang, eine Linksdrehung nachzuweisen, mit Ausnahme allerdings der Phloridzintage, wo wir eine Linksdrehung bis zu 0,55 Proz. im vergorenen Harn sahen. Dafs es sich aber in diesen Fällen stets um Glykuronsäure handelt, ist durch die Untersuchungen von P. Mayer und Neuberg*) sichergestellt, da nach diesen Autoren der positive Ausfall der Orcinreaktion genügt, um mit Sicherheit sagen zu können, dafs sich Glykuronsäure im Urin befindet.

Was nun die Phenolausscheidung betrifft, so sehen wir dieselbe während der Phloridzinperiode wiederum gestiegen (48 mg gegen 34 mg in der Vor- und 39 mg in der Nachperiode). Allein auch an den anderen Tagen ist die Phenolmenge im Vergleich zu den Werten, die wir als normal bei Menschen anzusehen pflegen (nach Strasser 50 bis 70 mg), als relativ hoch zu bezeichnen. Wir wissen jedoch durch die Untersuchungen von J. Munk u. a., dafs Herbivoren viel mehr Phenol ausscheiden als Karnivoren. So

*) Paul Mayer und Neuberg. Zeitschr. f. phys. Chemie, 29, 256.

scheidet z. B. nach J. Munk das Pferd fast 1800mal so viel Phenol aus als der Mensch.

Ebenso wie das Phenol zeigt auch das Indikan während der Phloridzintage eine Steigerung, die Jaffésche Probe sowohl wie die Obermeyersche ergiebt eine tiefblaue Färbung.

Versuch IV.

Drei Kaninchen. Die tägliche Nahrung bestand in 400 g Kohlrabi und 100 g Brot. Die Untersuchungen wurden täglich vorgenommen.

Datum	Urinmenge	Trommer	Polarisation vor Vergärung Proz.	Polarisation nach Vergärung Proz.	Orcin	Indikan	Phenol mg	N	Bemerkungen
21. Juni	220	—	—	—	—	—	19,32	Pro Tag 1,18 g	Vorperiode
22. „	235	—	—	—	—	—	36,30		
23. „	165	—	—	—	—	—	34,67		
24. „	225	+	2,5 r.	—	+	—	41,60	Pro Tag 1,225 g	Jedes Kaninch.
25. „	300	+	1,75 r.	0,2 l.	+	+ sehr stark	61,29		täglich 0,5 g
26. „	290	+	2,2 r.	0.25 l.	+	+ „ „	50,60		Phloridzin subk.
27. „	230	—	—	—	+	—	41,08	Pro Tag 1,57 g	Nachperiode
28. „	380	—	0,1 r.	—	+	—	39,15		
29. „	340	—	—	—	—	—	34,63		
30. „	230	—	—	—	—	—	17,68		

Dieser Versuch zeigt das Auftreten von Glykuronsäure im Harn erst während der Phloridzinperiode, während in der Vorperiode die Orcinprobe stets negativ ausfiel. Mit dem Auftreten der Orcinreaktion zeigt sich auch nach Phloridzinzufuhr wiederum eine starke Indikanausscheidung, zugleich steigt das Phenol um ein Bedeutendes. Wir sehen nämlich, dafs letzteres in der Vor- und Nachperiode durchschnittlich 30 mg beträgt, während es unter dem Einflusse der Phloridzineinwirkung auf 51 mg im Durchschnitt steigt, also fast um das Doppelte. Freilich haben wir keinen Parallelismus in der Steigerung des Phenols resp. Indikans und dem Auftreten der Orcinreaktion. Denn auch an den beiden ersten Tagen der Nachperiode wird Glykuronsäure ausgeschieden, obwohl die Indikanreaktion negativ ausfällt und die Phenolmenge sinkt. Allein die letztere ist doch immerhin noch recht grofs und würde eine vermehrte Bildung der Glykuronsäure auch an den beiden

Tagen der Nachperiode erklärlich erscheinen lassen. Viel wahrscheinlicher ist es mir aber, dafs sich unter dem Einflufs des Phloridzins noch eine ganze Reihe anderer Körper im Organismus bildet, die sich mit Glykuronsäure paaren, und dafs die Ausscheidung dieser Körper noch einige Tage nach der Phloridzininjektion andauert.

Die Stickstoffausscheidung zeigt nichts Auffälliges.

3. Einflufs der Phloridzinzufuhr auf die Phenol-, Indoxyl- und Glykuronsäureausscheidung beim Menschen.

Nach diesen Tierversuchen ging ich dazu über, an Menschen ähnliche Versuche anzustellen. Ich gab zunächst Phloridzin per os. Da sich aber danach keine Wirkung zeigte, so spritzte ich mit Genehmigung der betreffenden Patienten 0,25 g Phloridzin subkutan ein, eine Dosis, die erfahrungsgemäfs zur Erzeugung der Glykusurie ausreicht, ohne sonst irgend welche Störungen des Allgemeinbefindens zu bewirken.

Die Versuche wurden an Patienten der I. medizinischen Klinik angestellt. Die Nahrungsaufnahme war die gewöhnliche Charitékost, die als eine ziemlich gleichmäfsige anzusehen ist, wie ich schon bei früheren Stoffwechseluntersuchungen zu beobachten Gelegenheit hatte.

Versuch V.

Frieda M. Pat. hat Diphtherie durchgemacht, ist bereits längere Zeit aufser Bett und ohne Beschwerden.

Datum	Urinmenge	Trommer	Polarisation vor Vergärung Proz.	Polarisation nach Vergärung Proz.	Orcin	Indikan	Phenol mg	N g	Bemerkungen
7. Juli	1000	—	0,1 l.	—	+	+ schwach	68,94	6,22	
8. „	1300	—	0,1 l.	—	—	+ „	112,04	6,37	Vorperiode
9. „	1100	—	0,1 l.	—	—	—	73,25	6,79	
10. „	1100	—	0,1 l.	—	—	—	69,80	5,69	2 g Phloridzin per os
11. „	1000	—	0,1 l.	--	+	—	98,37	5,57	7 g Phloridzin per os
12. „	1000	+	1,3 r.	0,15 l.	+	—	188,40	8,12	0,25 g Phloridzin subkutan
13. „	400	+ schwach	—	0,2 l.	+	—	52,65	4,48	
14. „	500	+ „	—	0,15 l.	+	—	30,93	5,68	Nachperiode
15. „	900	—	—	—	+	—	85,39	7,20	

Somit zeigt sich beim Menschen nach subkutaner Injektion von Phloridzin in kleinen Mengen eine Steigerung der Phenolausscheidung von 84 mg in der Vorperiode und 55 mg in der Nachperiode (Durchschnittszahlen) auf 188 mg, d. h. um mehr als 100 Proz. Dagegen trat niemals Indikan auf, ein Beweis mehr für die von Brieger, Salkowski, Blumenthal u. a. oft wiederholte Beobachtung, dafs Phenol- und Indikanausscheidung beim Menschen nicht parallel gehen.

Ferner sehen wir, dafs unter dem Einflufs der Phloridzinwirkung mehr Glykuronsäure ausgeschieden wird. In der Vorperiode zeigte der Harn die seit Haas vielfach beobachtete normale Linksdrehung, die offenbar auf der zuletzt von P. Mayer und Neuberg genau beobachteten Thatsache beruht, dafs sich in jedem normalen Harn Glykuronsäure findet. Freilich haben wir nur zweimal die Orcinreaktion nachweisen können, auffälligerweise aber einmal, als Indikan im Harn war, das andere Mal, als sich eine ziemlich grofse Phenolmenge fand (98 mg).

Freilich war die Orcinreaktion einmal negativ bei einer Phenolausscheidung von 112 mg. Es würde das darauf hindeuten, dafs zur Bindung der im Darm gebildeten Fäulnisstoffe (Phenol u. s. w.) die Schwefelsäure meist ausreichend ist. Tritt aber noch aufserhalb des Darms Phenol- resp. Indoxylbildung auf, so mufs eben die Glykuronsäure als Bindungsmittel eingreifen.

Dafs die Phenolvermehrung nach Phloridzin nicht auf vermehrter Darmfäulnis beruhen kann, geht aus diesem Versuche klar hervor, da ja die innerliche Darreichung des Mittels auf die Ausscheidung der Fäulnisprodukte ohne Einflufs blieb.

Für die vermehrte Glykuronsäureausscheidung an den Tagen der Nachperiode möchte ich auf die Erklärung verweisen, die ich beim Versuch IV gegeben habe. Die Stickstoffausscheidung zeigt an dem Phloridzintage eine Vermehrung gegen die Vor- und Nachperiode.

Versuch VI.

Fräulein S. Patientin hatte Angina, ist jetzt völlig gesund und aufser Bett.

Datum	Urinmenge	Trommer	Polarisation vor Vergärung Proz.	Polarisation nach Vergärung Proz.	Indikan	Orcin	Phenol mg	N g	Bemerkungen
18. Juli	1200	—	—	—	+ schwach	+	46.01	8,52	Vorperiode
19. „	1000	—	0,1 l.	—	+ stark	—	63,46	8,23	
20. „	1710	+	1,6 r.	0,2 l.	—	+	134,17	10,15	0,25 g Phloridzin subk.
21. „	610	+ angedeutet	0,25 l.	—	—	+	47,79	6,01	Nachperiode
22. „	800	+ beginnt schon in der Kälte	0,2 l.	—	—	+	72,08	7,43	
23. „	1250		0,1 l.	—	—	—	58,76	8,35	

Unter dem Einfluſs des Phloridzins ist also die Phenolmenge von 55 mg in der Vor- und Nachperiode auf 134 mg gestiegen, das ist beinahe das Dreifache. Auf die Indoxylausscheidung hat es dagegen keinen Einfluſs gezeigt. Die Glykuronsäureausscheidung ist wiederum nach Phloridzin vermehrt und zwar dauert die Vermehrung noch einige Tage nachher an. Betrachten wir aber den Versuch lediglich vom Standpunkte der Glykuronsäureausscheidung, so sehen wir auch hier, wie schon in allen anderen Versuchen, daſs die Orcinreaction fast immer positiv ausfällt, sobald reichlich Indoxyl oder Phenol im Harn ist.

Versuch VII.

Herr B. Der Patient leidet, wie ich erst nachträglich erfuhr, viel an Verstopfung.

Datum	Urinmenge	Trommer	Polarisation vor Vergärung Proz.	Polarisation nach Vergärung Proz.	Orcin	Indikan	Phenol mg	N g	Bemerkungen
4. August	2260	—	—	—	—	+ schwach	167,07	15,18	Vorperiode
5. „	2250	—	—	—	—	+ „	105,45	12,33	
6. „	2600	+	2,4 r.	Spur links	+	+ „	380,76	17,01	0,25 g Phloridzin subk.
7. „	2650	—	0,1 r.	—	—	—	114,19	11,13	Nachperiode
8. „	1200 (Verlust)	—	—	—	+	+ schwach	59,23	5,71	
9. „	1400	—	—	—	+	+ „	mifsgl.	8,44	

Versuch VIII.

Fräulein K. Scharlachrekonvaleszentin.

Datum	Urinmenge	Trommer	Polarisation vor Vergärung Proz.	Polarisation nach Vergärung Proz.	Orcin	Indikan	Phenol mg	N g	Bemerkungen
4. August	1350	—	—	—	—	+ mittel	55	10,73	Vorperiode
5. „	1140	—	—	—	+	+ stark	53,81	6,75	
6. „	1200	+	1,75 r.	0,1 l.	+	+ schwach	134,45	5,61	0,25 g Phloridzin subk.
7. „	1400	—	—	—	+	+ mittel	73,79	8,62	Nachperiode
8. „	1300	—	—	—	+	+ stark	56,45	6,11	
9. „	600 (Verlust)	—	—	—	+	+ mittel	nicht bestimmt	4,06	

Aus Versuch VII und VIII geht neuerdings hervor, dafs die Phenolmenge nach Phloridzininjektion eine Steigerung erfährt, die hier das Zwei- bis Dreifache der durchschnittlichen Menge beträgt. Dagegen zeigt sich die Beeinflussung der Indoxylausscheidung wiederum nicht in dem Mafse. Andererseits zeigt der Versuch VIII die Abhängigkeit der Glykuronsäureausscheidung von dem Vorhandensein reichlicher Mengen Indoxyl oder Phenol in ganz charakteristischer Weise. Im Falle V, VI und VIII erscheint die Stickstoffmenge an den Phloridzintagen vermehrt, dagegen nicht im Falle VII.

Aus allen diesen Versuchen insgesamt geht unzweifelhaft hervor, dafs die Phloridzininjektion eine starke Vermehrung des Phenols im Gefolge hat. Auch zeigen sämtliche Kaninchenversuche eine Vermehrung der Indoxylausscheidung, während diese Beobachtung beim Menschen niemals gemacht werden konnte. Die Kaninchenversuche ergaben eine Steigerung des Indoxyls auch in den Fällen, wo schon an und für sich abnormerweise Indoxyl im Harn nachzuweisen war*).

Eine Erklärung für diese Thatsachen zu geben, will ich an anderer Stelle meiner Arbeit versuchen; zunächst wollen wir nur auf die Verhältnisse bei der Glykuronsäureausscheidung eingehen.

*) Anm. bei der Korrektur: Dafs meine Kaninchen meist in der Vor- und Nachperiode Indoxylurie zeigen, beruht, wie Dr. Blumenthal mir auf Grund seiner noch nicht publizierten Versuche mitteilt, darauf, dafs diese Kaninchen unterernährt waren. Er stellte ferner fest, dafs genügend und überernährte normale Kaninchen niemals Indoxylurie zeigen.

4. Die Abhängigkeit der Glykuronsäureausscheidung von der Phenol- und Indoxylbildung.

Baumann*) hat festgestellt, dafs, während im normalen Harn Phenol und Indoxyl als Atherschwefelsäuren und nur zu einem geringen Teile als zweite „phenolbildende" Substanz (d. h. Glykuronsäure) ausgeschieden werden, diese Verhältnisse sich sofort änderten, wenn er seinen Versuchstieren gröfsere Mengen Phenol zuführte. Er fand dann im Blut und in der Leber nur die zweite „phenolbildende" Substanz, und er bemerkt ausdrücklich, dafs nur der kleinere Teil des eingeführten Phenols als Phenolschwefelsäure, der gröfste Teil jedoch in der zweiten Verbindung, also als gepaarte Glykuronsäure, ausgeschieden wird.

Somit ist die im Organismus verfügbare Schwefelsäure nicht ausreichend, um alles Phenol und Indoxyl zu binden, sobald diese Körper in abnorm gesteigerter Menge im Organismus kreisen. In diesem Falle mufs also die Glykuronsäure, die sich sonst nur zum geringsten Teil mit Phenol und Indoxyl paart, weil ja diese Substanzen schon an Schwefelsäure gebunden sind, in gesteigerter Menge dazu verwandt werden, den Körper zu entgiften, was anscheinend die Hauptaufgabe aller dieser Synthesen im tierischen Organismus ist. Es ist sehr wahrscheinlich, dafs dieser Mangel an Schwefelsäure auch dann eintritt, wenn Phenol oder Indoxyl nicht von aufsen im Überschufs zugeführt wird, sondern im Körper selbst in abnormen Mengen gebildet wird, und eben dasselbe läfst sich für alle aromatischen Substanzen annehmen, die sich erfahrungsgemäfs mit Schwefelsäure oder Glykuronsäure paaren.

Meine Versuche sprechen sehr für eine solche Anschauung. Die Orcinreaktion hat sich nur selten positiv gezeigt, wenn im Harn lediglich die aus der normalen Darmfäulnis stammenden Produkte auftreten und auch wenn eine vermehrte Darmfäulnis auftrat und Phenolmengen von 167 mg ausgeschieden wurden, wie im Falle VII, war die Orcinreaktion beim Menschen meist negativ. Andererseits sehen wir allerdings, dafs, wenn die Indikanreaktion stark positiv ist, auch sehr häufig die Orcinprobe positiv ausfällt, und es scheint also ein viel deutlicherer Parallelismus in der Ausscheidung des Indoxyls und der Glykuronsäure vorhanden zu sein, als wir bei der Phenolausscheidung sehen.

Dagegen ist die Orcinreaktion niemals ausgeblieben, sobald

*) Baumann, Pflügers Archiv 13, 285.

unter der Einwirkung des Phloridzins Stoffwechselstörungen eintraten, die zur Vermehrung der aromatischen Produkte, insbesondere des Phenols und Indoxyls, führten. Das zeigen sowohl meine Versuche an Menschen, als auch ganz besonders an Kaninchen, bei denen zugleich fast immer eine starke Linksdrehung des Harns neben der positiven Orcinreaktion zu beobachten war.

Daraus geht also unzweifelhaft hervor, dafs die Glykuronsäureausscheidung von der Indoxyl- und Phenolbildung durchaus abhängig ist, ob diese Substanzen nun im Darmkanal oder an anderer Stelle im Organismus sich bilden. Dafür scheint mir insbesondere die in allen meinen Versuchen beobachtete Erscheinung zu sprechen, dafs fast niemals eine positive Orcinreaktion nachzuweisen war, ohne dafs zugleich im Harn Indoxyl oder Phenol reichlich vorhanden waren.

So lassen sich denn auch wohl die Beobachtungen Paul Mayers über das Auftreten von Glykuronsäure bei Vergiftungen, bei Zirkulations- und Respirationsstörungen und bei Diabetes erklären. Auch hier kommt es in den meisten Fällen zu einer vermehrten Indoxyl- resp. Phenolbildung und dadurch erst zu gesteigerter Glykuronsäureausscheidung. Diese Anschauung gewinnt eine besondere Stütze durch die Untersuchungen Blumenthals über Indoxylbildung bei Unterernährung, da bei starken Vergiftungen die Nahrungsaufnahme daniederliegt.

P. Mayer führt als Beweis für seine Auffassung, die in der Glykuronsäureausscheidung nur eine Folge verminderter Oxydation des Zuckers sieht, hauptsächlich auch die Beziehungen zwischen Zucker, Glykuronsäure und Oxalsäure an. Er geht dabei von der Voraussetzung aus, dafs die Oxalsäure ebenso ein Oxydationsprodukt der Glykuronsäure ist, wie diese aus dem Zucker stammt. Nun haben Lüthje*), Mills und Stradonsky**) gezeigt, dafs Kohlehydratzufuhr keinen Einflufs auf die Oxalsäureausscheidung hat; andererseits ist die Ansicht, dafs die Glykuronsäure nur aus dem Zucker stammt, auch nicht unbestritten geblieben. So hat O. Loewi in jüngster Zeit darauf hingewiesen, dafs die Glykuronsäureausscheidung nicht aus dem Zucker, sondern aus dem Eiweifs stammen kann. Dagegen hat P. Mayer bei Tieren, denen er grosse Mengen Traubenzucker gab, eine Oxalsäurevermehrung gesehen, und er beruft sich aufserdem auf Fürbringer*), der bei

*) Lüthje, Zeitschr. f. klin. Mediz. 35, 271.
**) Stradonsky, Virchows Archiv 1901.

einem Diabetiker hochgradige Oxalurie, und ferner auf Naunyn**), der selbst in leichten Fällen von Diabetes eine starke Vermehrung der Oxalsäure fand.

Die Oxalurie bei Diabetikern ist auch von anderen Autoren festgestellt worden, aber bei diesen liegen die Verhältnisse anders. Hier erscheint mir die vermehrte Oxalsäureausscheidung eher als Ursache der Glykuronsäurevermehrung. Oxalsäure macht Indikanurie, wie Harnack gezeigt hat, und gesteigerte Indoxyl- resp. Phenolbildung bewirkt Vermehrung der Glykuronsäure, wie ich in fast allen meinen Versuchen zeigen konnte. v. Moraczewski***) hat in jüngster Zeit, gestützt auf die Untersuchungen Harnacks, fast zur Gewifsheit gemacht, dafs Diabetes, Oxalurie und Indikanurie in einem ursächlichen Zusammenhange stehen. Dafür spricht auch die Beobachtung von Otto†), der bei Diabetes sowohl Oxalurie als auch Indikanurie sah. Ferner hat Teubaum††) in hochgradigen Fällen von Diabetes eine starke Steigerung der Kalkausscheidung beobachtet, und v. Moraczewski†††) sieht sogar in der vermehrten Kalkausscheidung etwas für den Diabetes absolut Charakteristisches, ebenso wie diese Kalkausscheidung ja auch für die Oxalsäurevergiftung charakteristisch ist. Dazu kommen ferner die Beobachtungen von Kobert und Küfsner§), wonach im Harn von Kaninchen, die sie mit Oxalsäure vergiftet hatten, reichlich reduzierende Substanzen auftraten, aufserdem die schon erwähnten Untersuchungen Senators, der bei vielen Kinderkrankheiten vermehrte Indikanurie bei gleichzeitig gesteigerter Kalkausscheidung sah, offenbar auch infolge von Oxalsäurewirkung.

Nimmt man dies alles zusammen, so erscheint es nicht ausgeschlossen, dafs beim Diabetes infolge der Oxalsäurewirkung vermehrte Indoxylbildung durch Zerfall von Körpereiweifs stattfindet und daher die Glykuronsäure in gesteigertem Mafse zur Bindung verwendet wird.

Andererseits ist es mir nach meinen Versuchen bei Phloridzindiabetes wahrscheinlich, dafs auch die schon von verschiedenen Seiten§§) konstatierte Vermehrung des Phenols beim Diabetes eine Ursache der gesteigerten Glykuronsäureausscheidung ist.

*) Fürbringer, Verh. des Vereins für innere Medizin 1898.
**) Naunyn, Der Diabetes mellitus.
***) v. Moraczewski, Zentralbl. f. innere Med. 1901, Nr. 28.
†) Otto, Pflügers Archiv 33, 607—618.
††) Teubaum, Zeitschr. f. Biologie 33, S. 379—403.
†††) v. Moraczewski, Zentralbl. f. innere Med. 18, Nr. 36.
§) Kobert und Küfsner, Virchows Archiv 78, 234.
§§) Vergl. Strafser, Zeitschr. f. klin. Med. 24, 543—555.

Ebenso läfst sich die nach Vergiftungen und Zirkulations- oder Respirationsstörungen auftretende Vermehrung der Glykuronsäure erklären. So hat von Jaksch*) bei Schwefelsäurevergiftung reduzierende Substanzen im Urin nachgewiesen, während Harnack nach Schwefelsäurevergiftung Indikanurie beobachtete. In einem in der Charité beobachteten Falle von Schwefelsäurevergiftung fand Blumenthal, wie er mir mitteilte, neben Traubenzucker in den ersten beiden Tagen äufserst starke Indikanurie. Am dritten und vierten Tage verschwand der Traubenzucker; es war nunmehr neben der Indikanurie reichlich Glykuronsäure nachweisbar, bis auch diese nach einigen Tagen zugleich mit dem Indoxyl verschwand. G. Hoppe-Seyler**) teilte mit, dafs nach subkutaner Einspritzung von Phenylhydrazin bei einem Kaninchen eine reduzierende Substanz im Harn auftrat. Dabei war ziemlich viel Phenol vorhanden, ohne dafs die Menge der Ätherschwefelsäuren eine abnorm grofse gewesen wäre. Ich selbst habe nach Phloridzininjektion eine gesteigerte Glykuronsäureausscheidung gesehen, die auf nichts anderes als auf eine Vermehrung der glykuronsäurebindenden Substanzen zu beziehen ist, da Indoxyl meistenteils, Phenol aber stets, in abnormen Mengen im Urin nachzuweisen war. Gleichzeitig möchte ich auf Versuch II und III hinweisen, wo auch ohne Phloridzininjektion Glykosurie bestand im Verein mit Indikanurie und stark vermehrter Glykuronsäureausscheidung. Bei Sauerstoffmangel hat ferner Reale***), wie ich beim Niederschreiben dieser Arbeit ersehe, erheblich gesteigerte Ausscheidung von Ätherschwefelsäuren gesehen und er weist ferner darauf hin, dafs bei Arthritikern konstant starke Indikanurie zu beobachten ist, die stets mit Vermehrung der Glykuronsäure einhergeht.

Ich glaube aber auch für die Richtigkeit der Ansicht, dafs in den meisten Fällen die Phenol - Indoxyl - usw. - Vermehrung als die Ursache der gesteigerten Glykuronsäureausscheidung anzusehen ist, einen völlig einwandfreien Beweis anführen zu können. Wenn es nämlich richtig wäre, dafs immer zuerst eine gesteigerte Glykuronsäurebildung vorhanden sein mufs, damit die Paarung mit Phenol resp. Indoxyl erfolgt, so müfste ja, wenn man die Glykuronsäure künstlich vermehrte, auch eine Steigerung der Phenol- resp. Indoxylausscheidung erfolgen.

Es wurde daher der folgende Versuch unternommen.

**) von Jaksch, daselbst 9, 22.

**) G. Hoppe-Seyler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 35.

***) Reale, Wiener med. Wochenschr. 1901, Nr. 34, 35 u. 36.

Versuch IX.

Drei Kaninchen. Tägliche Nahrung: 400 g Kohlrabi und 100 g Brot.

Datum	Urinmenge	Trommer	Polarisation vor Vergärung Proz.	Polarisation nach Vergärung Proz	Orcin	Indikan	Phenol mg	N g	Bemerkungen
17. Juli	300	—	—	—	—	—	30,4	1,478	Vorperiode
18. „	300	—	—	—	+	—	36,05	1,738	
19. „	350	+ schwach	0,1 r.	—	+	+ stark	38,87	2,03	2,75 g Glykuronsäure subkut. injiziert
20. „	300	+ „	0,2 r.	0,1 r.	+	—	36,30	1,621	2 g Glykuronsäure subk. injiz.
21. „	210	+ „	0,2 r.	—	—	—	29,85	2,01	Nachperiode
22. „	300	—	—	—	—	—	34,16	2,26	

Die Rechtsdrehung im Urin unter dem Einfluss der Glykuronsäureinjektion möchte ich auf das Vorhandensein freier Glykuronsäure zurückführen, die nach subkutaner Injektion rasch genug die Blutbahn durcheilt, um unzersetzt und ungepaart in den Harn zu gelangen.

Aus dem Versuch ergiebt sich, dass Indikan nur an einem Tage auftrat, Phenol dagegen an den Glykuronsäuretagen keine Vermehrung zeigte.

Auf Grund dieses Versuches im Zusammenhang mit dem früher Angeführten ist anzunehmen, dass die Vermehrung der Glykuronsäure eine vermehrte Phenol- und Indoxylausscheidung nach sich zieht.

5. Die Bildung von Phenolen und Indoxyl im intermediären Stoffwechsel.

Nach den Ausführungen, die ich schon in der Einleitung über das nunmehr als sicher anzunehmende Entstehen einer Vorstufe des Indoxyls im Gewebe gemacht habe, liegt ja der Gedanke sehr nahe, dass dann auch Phenol ohne bakterielle Thätigkeit in den Organen gebildet werden kann. Dafür spricht zunächst eine ganze Reihe von Beobachtungen aus der Litteratur.

Friedrich Müller*) hat Versuche über Indikan- und Phenolausscheidung an hungernden Menschen und Tieren gemacht. Er

*) Friedrich Müller, l. c.

beobachtete beim Menschen eine Steigerung der Phenolausscheidung bis zum achten bezw. neunten Hungertage von 16 mg bis auf 137 bezw. 155 mg. Da er jedoch in den Organen hungernder Tiere niemals Phenol nachweisen konnte, so hält er es für sicher, dafs das Phenol und Indoxyl bei hungernden Individuen aus der Fäulnis der Darmsekrete stammt, wie ja auch Nencki*) in seiner Polemik gegen Salkowski ausgeführt hatte. Auch J. Munk**), der bei Hungertieren starken Phenolgehalt konstatierte, meint, dafs die Phenole aus den infolge des Hungerns länger zurückbehaltenen Darmsekreten stammen.

Brieger***) nimmt an, dafs der bei einzelnen Infektionskrankheiten auftretende erhöhte Phenolgehalt des Harns nicht auf abnorme Darmzersetzungen zu beziehen ist. Da er aber nicht der Ansicht ist, dafs Phenol ohne Bakterienwirkung aus blofsem Zerfall des Körpereiweifses entstehen kann, so hält er es für sicher, dafs die Erreger dieser Infektionskrankheiten ähnlich wie Fäulnisbakterien auf die Gewebe wirken. Auch Scotti†) fand, dafs im Harn ohne Störungen von seiten des Darmkanals grofse Mengen Ätherschwefelsäuren vorkommen können.

Senator††) fand stets gepaarte Schwefelsäuren im Harn von Neugeborenen, und auch im Fruchtwasser konnte er dieselben nachweisen. In zwei von fünf Fällen gelang ihm der Nachweis von Phenol im Harn Neugeborener. Er erörtert die Möglichkeit der Herkunft der organischen Paarlinge (Phenol und Indoxyl) und meint, dieselbe müsse im mütterlichen Blute oder im Körper des Kindes gesucht werden.

Hier mufs nun aber die Darmfäulnis als Quelle jener Körper sofort ausgeschlossen werden, da Fäulniserreger im Darm Neugeborener nicht vorhanden sind. Es bleibt also, folgert Senator, nur übrig, dafs die aromatischen Paarlinge der Ätherschwefelsäuren entweder aus den Geweben des kindlichen Organismus infolge tiefer mit dem Stoffwechsel verknüpfter Zersetzungen entstehen, oder dafs sie aus dem mütterlichen Blute stammen. Obwohl Senator anerkennt, dafs die erstere Annahme wohl denkbar wäre, entscheidet er sich doch für die Herkunft der Ätherschwefelsäuren aus dem mütterlichen Blut.

*) Nencki, Zentralbl. f. d. med. Wiss. 1878, Nr. 34.
**) J. Munk, Eulenburgs Realenzyklop. unter „Phenol".
***) Brieger, Zeitschr. f. klin. Med. 1881, S. 466.
†) Scotti, Malys Jahresberichte 1900, S. 812.
††) Senator, Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, 1—9.

Nun haben aber Baumann und Christiani*) und schon vorher F. Hoppe-Seyler**) nachgewiesen, dafs im Blute Ätherschwefelsäuren nicht vorhanden sind; andererseits fand Demant***) in den Organen von menschlichen und tierischen Föten im Gegensatz zu Friedrich Müller stets Phenol. Auch Baumann†) hält es für sehr wahrscheinlich, dafs selbst unter normalen Verhältnissen auch in den Geweben selbst Stoffe entstehen können, die als Ätherschwefelsäuren ausgeschieden werden. Sowohl Untersuchungen von van der Velde und Salkowski, als auch ein von Baumann selbst bei einem Menschen mit Dünndarmfistel angestellter Versuch lassen, wie er sagt, diesen Schlufs zu, wenn er auch gleich hinzufügt, dafs die aromatischen Produkte, die als Ätherschwefelsäuren ausgeschieden werden, in der Regel wohl nur der Darmfäulnis entstammen. Allein er teilt doch in derselben Arbeit mit, dafs die aromatischen Oxysäuren — Hydroparakumarsäure und Paraoxyphenylessigsäure — zweifelsohne nicht nur im Darm, sondern selbst in der Norm auch in den Geweben gebildet werden können.

Meine Versuche ergaben nun bei der Phloridzinvergiftung bei Tieren stets vermehrte Phenolausscheidung mit Indoxylurie, und bei Tieren und Menschen konstant Vermehrung der Phenolausscheidung. Dafs diese nicht die Folge vermehrter Darmfäulnis sein kann, glaube ich bereits erwiesen zu haben. Das Phenol mufs also durch einen der Eiweifsfäulnis ähnlichen Prozefs im Gewebe, aber ohne bakterielle Thätigkeit, entstanden sein.

von Mering hat bekanntlich bei seinen Untersuchungen über den Phloridzindiabetes nachweisen können, dafs dabei die Zuckerbildung aus dem Körpereiweifs herrührt, weil bei gewöhnlicher Kost die Menge der Kohlehydrate keinen Einflufs auf die ausgeschiedenen Zuckermengen hatte. Er giebt freilich an, dafs dabei kein gesteigerter Eiweifszerfall stattfindet, was er damit erklärt, dafs bei ausreichender Nahrung die Nichtzersetzung des Zuckers selbst in gröfseren Mengen die Stickstoffausscheidung nicht beeinflufst. Ich konnte nun bei meinen Versuchen II, V, VI und auch VII eine Steigerung der Stickstoffmenge nach Phloridzininjektion konstatieren. Es würde dann bewiesen sein, dafs bei einzelnen Individuen nach Phloridzin eine vermehrte Stick-

*) Baumann und Christiani, Zeitschr. f. physiol. Chem. 2, 350.
**) Hoppe-Seyler, Pflügers Archiv 5, 176.
***) Demant, Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, 387.
†) Baumann, daselbst 10, 126.

stoffausscheidung eintritt, wie ja auch bei Diabetikern nach den Mitteilungen einzelner Forscher die Stickstoffausscheidung durchaus verschieden sich verhält.

Sicher ist aber doch, dafs das Phloridzin auf die Gewebe im Sinne einer bedeutenden Stoffwechselstörung einwirkt und zu abnormen Vorgängen in den Zellen selbst führt. Das ist in noch viel höherem Grade bei hungernden Individuen der Fall. Hier findet ja schon an und für sich eine lebhafte Zerstörung des Körpereiweifses statt. Spritzt man aber Hungertieren Phloridzin ein, so steigt, wie v. Mering nachgewiesen hat, der Eiweifszerfall bis auf 30 ja 100 Proz. und zwar um so viel mehr, je länger das Tier hungert. Wenn also die Annahme richtig ist, dafs bei Stoffwechselstörungen im Organismus selbst die aromatischen Körper, Phenol, Indol u. s. w. entstehen können, dann mufs sich das bei Hungertieren deutlich zeigen.

Dazu dienten folgende Versuche an hungernden Kaninchen.

Versuch X.

Drei hungernde Kaninchen.

Hungertage	Urinmenge	Trommer	Polarisation vor Vergärung Proz.	Polarisation nach Vergärung Proz.	Orcin	Phenol	Indikan	N g	Bemerkungen
1.	350	—	01,5 r.	—	+	29,54	+ stark	0,79	Vorperiode
2.	340	—	0,1 r.	—	+	37,60	+ sehr stark	1,33	
3.	315	+	1,0 r	0,25 l.	+ nach Vergär.	59,23	+ „ „	5,38	Täglich 0,5 g subkutan Phloridzin
4.	200 (Verl.)	+	0,65 r.	0,2 l.	+ nach Vergär.	35,72 (Verl.)	+ „ „	3,05 (Verl.)	

An dem letzten Versuchstage starben zwei Kaninchen im Laufe von 24 Stunden, und ich habe demgemäfs nicht den gesamten Urin bekommen. Die Tiere waren sämtlich sehr mager und schwächlich und wir wissen ja durch Voit, Pettenkofer, J. Munk u. a., dafs geringer Fettvorrat zu einem starken Eiweifszerfall im Hunger führt, der in unserem Falle durch die Phloridzinwirkung noch gesteigert wird.

Es geht nun aus diesem Versuche hervor, dafs Hungertiere reichlich Phenol und Indoxyl ausscheiden und dafs die Phenolurie noch eine beträchtliche Steigerung erfährt unter dem Einflusse des durch Phloridzin bewirkten erhöhten Eiweifszerfalls. Gleichzeitig zeigt sich wieder Glykuronsäure im Urin; die Linksdrehung kann nicht auf Oxybuttersäure bezogen werden. Da Aceton niemals nachzuweisen war, ist kaum anzunehmen, dafs Oxybuttersäure vorhanden war.

Versuch XI.

Drei hungernde Kaninchen. Die Tiere erhielten vorher vier Tage lang nur Milch zu trinken, um eine Ansammlung von fäulnisfähigen Nahrungsresten im Darm möglichst zu verhindern. Ich habe dabei die Ausscheidung von Phenol und Indoxyl lediglich unter dem Einflusse des Hungers prüfen wollen und demgemäfs kein Phloridzin eingespritzt.

Hungertage	Urinmenge	Polarisation	Orcin	Aceton	Indikan	Phenol mg	N g
1. Tag	200	0,1 l.	+	—	+ stark	42,14	4,29
2. „	250	—	+	—	+ „	42,30	4,83
3. „	200	—	+	—	+ „	31,34	4,36
4. „	120	—	+	—	+ „	25,07	2,12
5. „	210	—	+	—	+ „	nicht bestimmt	

An diesem letzten Tage starben zwei Tiere. Der Dickdarm enthielt breiig-flüssigen, völlig geruchlosen Kot. Auch diese Tiere waren sehr mager und schwächlich und die aufserordentlich starke Stickstoffausscheidung ist wohl die Folge davon, dafs so aufserordentlich geringe Fettvorräte im Organismus vorhanden waren.

Während des ganzen Versuches zeigt sich starke Indoxylurie. Aceton war niemals vorhanden.

Von Interesse ist es wiederum, dafs während der ganzen Zeit, wo Indoxyl und Phenol in grofsen Mengen ausgeschieden wurde, stets Glykuronsäure durch die Orcin-Salzsäureprobe nachzuweisen war.

Versuch XII.

Drei Kaninchen, die ich ebenfalls zunächst vier Tage lang mit Milch fütterte und dann hungern liefs, spritzte ich wie in Versuch X Phloridzin 0,5 g subkutan ein.

Hungertag	Urinmenge	Polarisation	Aceton	Orcin	Indikan	Phenol mg	N g	Bemerkungen
1.	200	0.1 l.	—	+	+ stark	35,80	2.26	Vorperiode
2.	250	—	—	+	+ „	31,34	2,38	
3.	250	—	—	+	+ „	39,79	2,29	Je 0,5 g Phloridzin subkutan
4.	400	1 Proz. r. vor, 0,15 l. nach Vergärung	—	+	+ „	60.8	4.68	
5.	220	Spur r.	—	+	+ „	36	3,69	Nachperiode
6.	200	0,1 l.	—	+	+ sehr stark	35,15	3.28	
7.	220	0,1 l.	—	+	+ (ganz tiefblaue Färb.)	36,98	3,19	

Am dritten Hungertage wurden 0,5 g Phloridzin injiziert, wobei keine Glykosurie und keine Stickstoffvermehrung im Harn auftrat. Dabei aber ist auch Phenol und Indoxyl gegen die vorhergehenden Tage nicht vermehrt. Mit dem Augenblicke aber, wo das Phloridzin seine spezifische Wirkung ausübt, wo also der von Mering bei Hungertieren beobachtete starke Eiweifszerfall eintritt, zugleich mit der Ausscheidung von Zucker, da setzt auch sofort eine starke Steigerung der Phenolmenge ein. Es ist das ein neuer Beweis dafür, dafs die Phenolvermehrung nach Phloridzin im Gewebe selbst durch abnormen Eiweifszerfall bewirkt wird. Zugleich sehen wir aber auch bei diesem Versuche so hohe Phenolmengen auftreten, wie wir sie sonst kaum bei ausreichend ernährten Tieren beobachteten.

Alle drei Versuche bei Hungertieren aber zeigen aufs deutlichste die Abhängigkeit der Glykuronsäureausscheidung von dem Gehalt des Harns an aromatischen Körpern, insbesondere des Phenols und Indoxyls.

Es ist das ein neuer Beweis dafür, dafs fast bei allen Stoffwechselstörungen, die zu einer Vermehrung der Glykuronsäure führen, ein abnormer Eiweifszerfall vorhergeht, der eine Bildung von Phenol, Indoxyl u. s. w. in den Geweben ohne bakterielle Thätigkeit hervorruft.

Dafs beim schweren Diabetes z. B. ein gesteigerter Eiweifszerfall vorhanden ist, das hat schon Naunyn hervorgehoben. Martin Jacoby*) fand eine Vermehrung der Harnsäure und der Alloxurkörper, was ebenfalls für vermehrten Eiweifszerfall beim Diabetiker spricht. Lauritzen**) sah auch in leichten Fällen von Diabetes geringe Stickstoffvermehrung im Harn. Es läfst sich demgemäfs annehmen, dafs die in vielen Diabetesfällen nachgewiesene Vermehrung der Glykuronsäure auf eine vermehrte Bildung von Phenol und Indoxyl in den Zellen selbst zurückzuführen ist. Ebenso wissen wir auch, dafs nach Kohlensäurevergiftung und bei allen Zuständen, die zu Störungen der Respiration führen, ein gesteigerter Eiweifszerfall eintritt; insbesondere konnte Jeanneret, der unter Naunyn***) arbeitete, zeigen, dafs der bei Kohlensäurevergiftung auftretende Diabetes mit einer Steigerung des Eiweifszerfalles einhergeht.

Betrachten wir nun aufserdem die Erfahrungen, die zahlreiche

*) Martin Jacoby, Zeitschr. f. klin. Medizin 32, 557 u. s. w.

**) Lauritzen, Zentralbl. f. innere Medizin 19, 25—27.

***) Naunyn, Archiv f. experim. Path. und Pharm. 3, 161.

Forscher über den Zusammenhang zwischen Diabetes, Oxalurie und Indikanurie gemacht haben, und nimmt man dann hinzu, dafs Harnack nach Oxalsäure gesteigerte Indikanausscheidung, wir selbst nach Phloridzinvergiftung stets gesteigerte Phenol- und meistenteils vermehrte Indoxylausscheidung gesehen haben, so ist auch hier eine Bildung der aromatischen Produkte durch Zerfall von Körpereiweifs nicht von der Hand zu weisen.

Aber auch die starke Phenol- und Indikanausscheidung im Hungerzustande möchte ich zum Teil wenigstens auf die Bildung dieser Stoffe im Gewebe beziehen. Es scheint mir nicht wahrscheinlich zu sein, dafs die Darmsekrete bei Hungertieren allein genügen sollten, so hohe Phenol- und Indoxylmengen zu liefern. Blutungen oder abnorme Fäulnis im Darm fand Blumenthal*) nie bei unterernährten oder kurze Zeit hungernden Kaninchen mit Indoxylurie. Für die Ansicht, dafs die bei Hungertieren auftretenden grofsen Phenol- resp. Indoxylmengen zum Teil aus dem abnormen Eiweifszerfall in den Organen herzuleiten sind, scheint mir insbesondere das prompte Aufhören der Indikanurie zu sprechen. das ich wiederholt (bei Versuch XI und XII) gesehen habe, sobald die Tiere wieder Nahrung erhielten. Hier mufste doch viel mehr fäulnisfähiges Material im Darm sein und doch kam es dabei zu keiner Indoxylausscheidung.

Hingegen ist darauf zu verweisen, dafs, wie F. N. Schultz**) hervorhebt, durch den fortgesetzten Verlust des Organeiweifses beim absoluten Hungern eine grofse Menge von Zellen infolge der Schädigung, die der Organismus erfährt, absterben müssen. Dafür spricht auch die Beobachtung von Sadowen***), der bei Hungertieren eine Steigerung der Kalkausscheidung gesehen hat. Man erinnere sich, dafs diese Erscheinung auch bei Oxalsäurevergiftung zu beobachten ist, und dafs anderseits Oxalsäure Indikanurie erzeugt.

Die Behauptung, dafs Phenol im Organismus entstehen kann ohne bakterielle Einwirkung, erhält auch ihre Stütze durch eine Reihe von Erwägungen rein chemischer Natur. Baumann und Salkowski haben für die Entstehung von Phenolen aus dem Eiweifs folgenden chemischen Prozefs nachgewiesen.

Aus dem zuerst gebildeten Tyrosin entsteht Hydroparakumar-

*) Anmerkung bei der Korrektur: Wird demnächst publiziert.

**) F. N. Schultz, Pflügers Archiv 76, 379—410.

***) Sadowen, Malys Jahresber. 18, 281.

säure = Paraoxyphenylpropionsäure *). Diese wird nicht ganz als solche eliminiert, sondern ein Teil verschwindet, ein Teil erscheint unverändert im Harn, ein Teil wandelt sich im Organismus zu Paraoxyphenylessigsäure, dann zu Parakresol um und wird als Ätherschwefelsäure ausgeschieden **). Ein kleiner Teil des Parakresols oxydiert sich im Tierkörper zu Paraoxybenzoesäure ***), die leicht in Kohlensäure und Phenol zerfällt.

Mit diesen chemischen Vorgängen kann man nun folgende Thatsachen in Zusammenhang bringen.

Das Auftreten von Tyrosin im Harn bei pathologischen Störungen, welche mit starkem Eiweifszerfall einhergehen, vor allem bei akuter Phosphorvergiftung ist eine bekannte Thatsache †). Ray, Dermatt und Lurk beobachteten bei gleichzeitiger Phosphor- und Phloridzinvergiftung einen gesteigerten Eiweifszerfall und als Zeichen eines solchen Tyrosin im Harn. Die aus jüngster Zeit stammenden Untersuchungen von M. Jacoby ††) haben für die Phosphorvergiftung eine überaus intensive Selbstverdauung der aseptisch erhaltenen Leber ergeben und Thatsachen für das physiologische Vorkommen eines tyrosinbildenden proteolytischen Fermentes in der Leber beigebracht.

Anderseits haben, wie ich schon früher ausführte, Baumann und nach ihm Thierfelder und Nuttal die Entstehung der Hydroparakumarsäure und der Paraoxyphenylessigsäure in den Geweben selbst, unabhängig von der Darmfäulnis, als sicher festgestellt.

Betrachtet man diese Thatsachen zusammen mit den Vorgängen, die zur Bildung der im Harn erscheinenden Phenole, des Parakresols und Phenols, führen, so wird man ohne weiteres zugestehen, dafs eine Entstehung von Phenol aus dem beim Eiweifszerfall in den Organen gebildeten Tyrosin, resp. den aromatischen Oxysäuren beinahe selbstverständlich erscheint.

Fasse ich nunmehr noch einmal die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen, so ergiebt sich folgendes:

1. Beim Phloridzindiabetes habe ich unter den von mir inne-

*) Baumann, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 12, 1452.

**) Derselbe, Zeitschr. f. physiol. Chemie 3, 250; Brieger, Zeitschr. f. klin. Medizin 3, 471.

***) Baumann, loc. cit.

†) Blendermann, Zeitschr. f. physiol. Chemie 6, 234.

††) Jacoby, daselbst 30, 149 ff.

gehaltenen Bedingungen sehr häufig eine Vermehrung des Indoxyls und stets eine solche des Phenols bis zu 200 Proz. gesehen.

2. Diese Indoxyl- resp. Phenolurie ist nicht auf eine vermehrte Darmfäulnis zu beziehen. Sie ist vielmehr die Folge von Stoffwechselstörungen in den Geweben selbst, welche das Phloridzin verursacht. Es kommt infolge des durch Phloridzin bewirkten abnormen Eiweifszerfalles zur Bildung von Phenol und Indoxyl in den Organen. Demnach kann also Phenol und Indoxyl ohne bakterielle Thätigkeit im tierischen Organismus gebildet werden.

3. Bei vermehrter Indoxyl- resp. Phenolausscheidung findet sich fast stets Glykuronsäure im Harn.

4. Die Bildung von Phenol und Indoxyl im Überschufs ist alsdann als die Ursache der gesteigerten Glykuronsäureausscheidung anzusehen. Es ist dabei wahrscheinlich, dafs die in den Organen selbst gebildeten aromatischen Produkte sich besonders leicht mit Glykuronsäure paaren.

Zum Schlusse sei es mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Geheimrat v. Leyden, für die Überlassung des klinischen Materials und für die Erlaubnis, diese Arbeit auf seiner Klinik anfertigen zu dürfen, ergebenst zu danken. Gleichfalls erfülle ich die angenehme Pflicht, Herrn Privatdozenten Dr. Blumenthal für die Anregung zu dieser Arbeit und für die Förderung, die er mir bei der Ausführung derselben stets in liebenswürdigster Weise hat angedeihen lassen, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

XXIX.

Ueber das Auftreten von Oxyphenyläthylamin bei Pankreasverdauung und über fermentative CO_2-Abspaltung.

Von Dr. **R. L. Emerson** (Boston U. S. A.).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

Bei Selbstverdauung von Pankreas hat man bisher als Endprodukte Ammoniak, Leucin, Tyrosin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin, Arginin und Histidin*) erhalten, sämtlich Stoffe, welche aus Eiweifs auch durch Hydrolyse darstellbar sind. Es ist dies nur ein Teil der wirklich gebildeten Produkte. Bei näherer Untersuchung gelingt es unschwer, noch eine Anzahl von noch nicht beschriebenen Körpern darzustellen, welche zum Teil physiologisches Interesse darbieten. Von solchen Befunden sei vorläufig erwähnt:

1. ein wasser- und alkohollöslicher krystallinischer, bei etwa 300° schmelzender, äufserst stickstoffreicher Körper (C:N = 11:5),
2. ein amorpher brauner, sehr leicht Pyrrol oder eine ähnliche Substanz abspaltender Körper (C:N = 10:1),
3. ein stickstoffhaltiger saurer Körper, dessen Benzoylverbindung ein gut krystallisierendes Kalisalz mit 11 Proz. Kalium liefert.

Über diese und noch andere mir aufgestofsene Produkte soll später eingehender berichtet werden.

Hingegen erscheint es mit Rücksicht auf anderenorts gemachte

*) Vgl. F. Kutscher, Die Endprodukte der Trypsinverdauung. Habilitationsschrift. Strafsburg, K. J. Trübner, 1899.

Befunde notwendig, auf ein viertes genauer untersuchtes Produkt, das Oxyphenyläthylamin, einzugehen *).

Dasselbe wurde auf folgendem Wege erhalten:

Achtzig von Fett befreite und gut zerkleinerte Rinderpankreas wurden mit etwa 30 Liter Wasser und einigen hundert Kubikzentimetern Toluol innig gemischt und unter oftmaligem Rühren 10 Tage bei 35 bis 40° der Digestion überlassen. Dann wurde die verflüssigte Masse, welche zu keinem Zeitpunkt Anzeichen von Fäulnis gezeigt hatte, durch Ansäuern mit Essigsäure und Kochen von noch vorhandenem koagulalabeln Eiweifs befreit, die klar filtrierte Flüssigkeit auf etwa 5 Liter eingeengt, mit Baryumkarbonat neutralisiert und bis zum Beginn der Tyrosinabscheidung eingedampft. Nach genügendem Stehenlassen in der Kälte wurde von dem ausgeschiedenen Rohtyrosin abgesaugt und die Flüssigkeit weiter eingeengt. Filterrückstand und Flüssigkeit wurden dann mit 2 Liter 95 proz. Alkohols geschüttelt. Das Rohtyrosin lieferte dabei einen am Boden sich absetzenden Sirup und eine darüberstehende alkoholische Lösung, das Tyrosin blieb zwischen beiden Schichten suspendiert. Auch in der eingedampften Flüssigkeit bildeten sich diese drei Schichten.

Für die Gewinnung des Oxyphenyläthylamins diente ausschliefslich die überstehende alkoholreiche Schichte. Dieselbe wurde abgehebert, der aus Tyrosinkrystallen und Sirup bestehende Rückstand neuerlich mit Alkohol geschüttelt, die überstehende Lösung wieder abgehebert und dieses Vorgehen so oft wiederholt, bis sich der Alkohol beim Schütteln mit dem Sirup-Tyrosingemenge nicht mehr färbte. Der gesamte Alkoholauszug wurde durch Destillation und schliefslich durch Eindampfen von Alkohol befreit, dann der zurückbleibende Sirup mit viel Aceton versetzt, wobei sich wieder drei Schichten ausschieden, zu unterst ein schwerer dicker Sirup, darüber ein hellgefärbter Niederschlag, zu oberst eine dunkelgefärbte acetonreiche Lösung. Diese Lösung wurde abgehebert und der Rückstand so oft mit Aceton geschüttelt, bis sich das Aceton beim Schütteln nicht mehr färbte. Sämtliche Acetonauszüge wurden vereinigt, abdestilliert, auf ein kleines Volum gebracht und neuerlich mit sehr grofsen Mengen Aceton (15 bis 18 Liter) versetzt, wobei jedoch kein Sirup mehr, sondern nur etwas Niederschlag ausfiel. Von diesem wurde abfiltriert, das Aceton abdestil-

*) Eine Mitteilung über diesen Befund habe ich in dem Journal of Medical Research gemacht.

liert und der Rückstand auf dem Wasserbad eingeengt, bis sich in der wässerigen Lösung schwarze teerartige Massen auszuscheiden begannen.

Die wässerige Lösung wurde nun erst noch mit Essigäther erschöpft, dann nach Schotten und Baumann benzoyliert, wobei ein voluminöser Niederschlag entstand. Derselbe wurde mit Wasser ausgewaschen und in heifsem Alkohol gelöst. Beim Verdunsten schied sich ein noch etwas gefärbter Körper ab, der nach dreimaligem Umkrystallisieren aus Alkohol völlig farblos erhalten wurde. Sein Schmelzpunkt lag bei 169° (unkorr.) und wurde durch weiteres Umkrystallisieren nicht verändert.

Zwei auf diesem Wege erhaltene Präparate gaben bei der Analyse nachstehende Zahlen:

	Präparat I		Präparat II	Berechnet für $C_{22}H_{19}NO_3 = C_8H_9NO(C_6H_5CO)_2$
C	76,45	76,91	76,93	76,50
H	5,63	5,62	5,66	5,54
N	4,30	4,22	—	4,06

Ein Teil von Präparat I wurde in einer Kochflasche mit konzentrierter Salzsäure unter dem Rückflufskühler gespalten. Nach sechs- bis achtstündigem Erhitzen wurde eine klare, beinahe farblose Lösung erhalten, aus welcher beim Erkalten reichlich Benzoesäure auskrystallisierte. Sie wurde durch anhaltende Destillation im strömenden Wasserdampf bis zum Verschwinden der sauren Reaktion des Destillates von Benzoesäure befreit und die Lösung des zurückbleibenden salzsauren Salzes zunächst mit gasförmigem Chlorwasserstoff gesättigt, wobei sich ein krystallinischer weifser Niederschlag abschied, der abgesaugt und getrocknet als Präparat III zur Analyse kam. Der trockene Körper schmolz bei 267° (unkorr.).

Ein Teil von Präparat II wurde mit Salzsäure wie oben gespalten, der Rückstand aber direkt zur Krystallisation gebracht. Dabei wurden nacheinander vier Fraktionen erhalten, welche die Schmelzpunkte 115°, 142°, 267° und 267° zeigten. Die letzten beiden Fraktionen wurden vereinigt zur Analyse benutzt (Präparat IV).

	Präparat III	Präparat IV	Berechnet für $C_8H_{11}NO.HCl$
C	54,66	54,96	55,32
H	6,98	7,08	6,96
N	8,41	8,10	8,08
Cl	20,46	20,49	20,41

Ein Teil von Präparat IV wurde in warmem Alkohol gelöst und mit einer alkoholischen Platinchloridlösung in geringem Überschufs versetzt. Es schied sich sofort ein aus sechsseitigen Plättchen bestehender Niederschlag ab, welcher mit Alkohol und Äther gewaschen und aus heifsem Alkohol umkrystallisiert wurde.

	Präparat V	Berechnet nach $(C_6H_{11}NO)_2H_2PtCl_6$
Pt	28,51	28,49
N	4,43	4,11

Um zu entscheiden, ob das Oxyphenyläthylamin nicht erst bei der Spaltung des Benzoylproduktes mit Salzsäure gebildet wird, habe ich einen Teil des Präparats III neuerdings benzoyliert. Dabei wurde ein dem ursprünglichen Benzoylprodukt durchaus gleiches Produkt mit dem Schmelzpunkt 168,5 erhalten.

Die wässerige Lösung des Hydrochlorats war fällbar durch Phosphorwolframsäure, Platinchlorid und Bromwasser (weifser Niederschlag), nicht durch Pikrinsäure und Jodquecksilberkalium, gab keine Xanthoprotein- und keine Millonsche Reaktion. Wohl aber gab die freie Base beim Erwärmen mit Millons Reagens schöne Rotfärbung.

Ein Oxyphenyläthylamin von anscheinend gleichen Eigenschaften ist bereits vor Jahren erhalten worden und zwar aus Tyrosin durch Erhitzen im Probierröhrchen auf 270°, wobei CO_2 abgespalten wird und die gebildete Base an den Wänden des Glases ansublimiert*). Diese giebt ein Hydrochlorat von obiger Zusammensetzung und ein Platindoppelsalz**). Barth***) erhielt aus ihr durch Schmelzen mit Kali Paraoxybenzoesäure und Ammoniak.

Es liegt danach am nächsten, anzunehmen, dafs die gefundene Base das dem Tyrosin entsprechende p-Oxyphenyläthylamin ist, welches sich bei der Pankreasautolyse aus zuerst entstandenem Tyrosin durch einen fermentativen Vorgang gebildet hat. Für diese Vorstellung spricht die leicht zu machende Beobachtung, dafs bei intensiver Pankreasverdauung die Menge des anfänglich reichlich vorhandenen Tyrosins später sehr merklich abnimmt.

Behufs Entscheidung dieser Frage wurde nachstehender Versuch angestellt:

20 g von Fett befreites und gut zerkleinertes Pankreas wurde

*) Schmitt und Nasse, Liebigs Annalen **133**, 214.

) Beilstein, 3. Aufl. II, 757; Liebigs Annalen **133, 214.

***) Barth, Liebigs Annalen **152**, 101.

mit 2 g Tyrosin, 100 ccm Wasser und einigen Kubikzentimetern Toluol zehn Tage bei 37° stehen gelassen.

Zur Kontrolle diente ein genau gleich angestellter Versuch ohne Tyrosinzusatz.

Nach beendigter Digestion wurde in beiden Proben, wie oben beschrieben, aber unter quantitativen Kautelen die Darstellung des Dibenzoyloxyphenyläthylamins vorgenommen. Die Tyrosinprobe lieferte 0,815 g, die Kontrollprobe blofs 0,135 g.

Es war sonach von dem zugesetzten Tyrosin ein erheblicher Teil in die Base umgewandelt worden.

Dieser Befund ist insofern von physiologischem Interesse, als er lehrt, dafs im Organismus eine fermentative CO_2-Abspaltung ohne gleichzeitige Sauerstoff- oder Wasseraufnahme möglich ist.

$$HO.C_6H_4.CH_2.CH(NH_2).COOH - CO_2 = HO.C_6H_4.CH_2.CH_2.NH_2.$$

An einem Oxydationsvorgang ist im vorliegenden Falle auch schon darum nicht zu denken, weil das Pankreas erfahrungsgemäfs arm an Oxydase ist und weil die Bedingungen der Digestion, bei welcher das Verdauungsgemenge unter einer dicken Toluolschicht stand, einer Sauerstoffzufuhr äufserst ungünstig waren.

Übrigens ist der vorliegende Befund nicht der einzige seiner Art und läfst auch auf ältere Beobachtungen eine Anwendung zu.

Das Auftreten von Amin- und Diaminbasen bei der Eiweifsfäulnis ist mehrfach auf eine ganz analoge durch Bakterien bewirkte CO_2-Abspaltung bezogen worden, so die Bildung von Putrescin aus Ornithin, von Kadaverin aus Lysin [Ellinger*)], von Phenyläthylamin aus Phenyalanin [Nencki, Spiro**)]. Hierher gehört möglicherweise auch das Auftreten von Methylamin bei Fäulnis glykokollhaltiger Proteide, z. B. des Fibrins [Emmerling***)].

Eine fermentative Abspaltung in aseptischen Gemischen liegt aufser in meinem Falle auch in der Beobachtung von Langstein†) vor, welcher bei langdauernder Pepsinverdauung ebenfalls Oxyphenyläthylamin auftreten sah, sodann in dem Befund von Lawrow††), der Putrescin und Kadaverin unter den Produkten einer sehr intensiven Magenverdauung auffand. Ferner ist einer Beob-

*) Ber. der deutsch. chem. Ges. 31, III, 3183.
**) Vergl. diese Beitr. 1, 347.
***) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 30, II, 1868.
†) Vergl. die nachstehende Mitteilung von L. Langstein.
††) Zeitschr. f. physiol. Chemie 33, 312.

achtung von Werigo*) zu gedenken, der zufolge bei Selbstverdauung von Pankreas Kadaverin entsteht.

Wenn es Werigo unentschieden lassen mufste, ob es sich dabei um ein Produkt bakterieller Zersetzung oder eine Wirkung von Pankreasfermenten handelte, so bin ich in der Lage, diese Frage mit Hülfe des nachstehenden, mir von Herrn Dr. Anton Steyrer zur Verfügung gestellten Befundes zu entscheiden.

Herr Dr. Steyrer vermochte nämlich bei im hiesigen Institut ausgeführten Versuchen einmal durch Benzoylierung aus aseptisch erhaltenen Pankreasverdauungsgemischen reichlich Benzoylkadaverin zu isolieren.

	Gefunden:	Berechnet:
C	73,7 Proz.	74,0
H	6,9 „	6,5
N	8,8 „	9,1

Das Molekulargewicht wurde im Mittel von drei Bestimmungen zu 298 (berechnet 308) gefunden. Die nach Abspaltung der Benzoyle verbleibende Base zeigte die Eigenschaften des Kadaverins.

Wenn nach dem Gesagten an einer fermentativen CO_2-Abspaltung aus Aminosäuren bei intensiver Pankreas- und Magenverdauung nicht gezweifelt werden kann, so mufs doch noch die Frage offen bleiben, ob hier eine Wirkung des reinen Trypsins und Pepsins oder anderer ihnen beigemengter Fermente vorliegt. Vor allem wird es aber wichtig sein, zu untersuchen, ob eine solche Form von CO_2-Abspaltung auch bei der Kohlensäurebildung im intermediären Stoffwechsel eine Rolle spielt. Denn in diesem Falle dürften unsere Vorstellungen über den Verlauf der Oxydation in den Geweben eine eingreifende Wandlung erfahren.

*) Pflügers Archiv 51, 362.

XXX.

Zur Kenntnis der Endprodukte der peptischen Verdauung.

Von Dr. **Leo Langstein** aus Wien.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

I.

Nachdem die Beobachtungen von Zunz*) gelehrt hatten, dafs sehr bald nach Beginn der Verdauung ein erheblicher Teil des Eiweifsstickstoffes in Form von die Biuretreaktion nicht mehr gebenden Körpern abgespalten wird, erforderte die Wichtigkeit dieses Befundes eine nähere Charakterisierung und ein eingehenderes Studium dieser Substanzen. Pfaundler**), der in Hofmeisters Laboratorium Untersuchungen in dieser Richtung anstellte, suchte vor allem darüber Entscheidung zu bringen, ob die in Rede stehenden Endprodukte den Erfahrungen der Hoppe-Seyler-schen***) Schule entsprechend ganz oder zum Teil aus einfachen Aminosäuren bestehen, oder aber aus komplizierteren Substanzen, „welche dann notwendig ihrem chemischen Charakter nach den Platz zwischen den „Peptonen“ und den Aminosäuren finden mufsten“. Er hat zu diesem Zwecke Serumalbumin und Fibrin durch sechs Monate der Verdauung mit Pepsinsalzsäure unterworfen, bei dem Verdauungsversuch mit ersterem Aminosäuren unter den Endprodukten der peptischen Spaltung vollständig vermifst, bei dem Versuch mit letzterem jedoch Leucin, wenn auch in geringer Menge, vorgefunden. Übereinstimmend positiv war jedoch das Ergebnis aller Versuche Pfaundlers in Bezug auf das Auftreten

*) E. Zunz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 132.

**) M. Pfaundler, Daselbst 30.

***) Hoppe-Seyler, Physiologische Chemie 2.

von Substanzen, die nicht den Charakter von einfachen Aminosäuren besitzen und mehr als einen Kohlenstoffkern im Moleküle aufweisen. Eine nähere chemische Charakterisierung dieser Körper hat Pfaundler aus äufseren Gründen nicht geben können.

Auf einem anderen Wege war Lawrow*) schon früher zur Anschauung gelangt, dafs die peptische Verdauung nicht mit der Bildung von solchen Substanzen abschliefse, „die noch den allgemeinen Charakter von Proteinsubstanzen" tragen, und er brachte so eine Stütze für die Anschauung Hoppe-Seylers bei, „dafs sich bei verlängerter Einwirkung der Verdauungsflüssigkeit aus Peptonen langsam Leucin, Tyrosin und unbekannte Körper bilden". Bekanntlich stand Kühne**), ebenso wie Neumeister***), der durch die letztgenannten Beobachtungen modifizierten Anschauung über die peptische Verdauung ablehnend gegenüber und hielt dafür, dafs das gefundene Leucin und Tyrosin nicht durch die peptische Spaltung aus dem Eiweifs, sondern aus der Magenschleimhaut oder dem mit Glyzerin bereiteten Rohenzyme bei der Auflösung in verdünnten Säuren entstehen.

In jüngster Zeit mehrten sich die Beobachtungen, die, in Bestätigung der Zunzschen Versuche, die Annahme Kühnes, dafs die spaltende Wirkung des Pepsins nicht über die Peptonbildung hinausgeht, hinfällig machten. Fränkel†) und ich konnten zeigen, dafs schon nach relativ kurzer peptischer Spaltung (14 Tage) mindestens vier Eiweifsspaltungsprodukte sich aus dem „Amphopepton" isolieren liefsen; von Salaskin††) wurde kürzlich gezeigt, dafs durch Verdauung mit Pepsinsalzsäure wenigstens aus gewissen Proteinen Leucinimid abgespalten werde, und in einer — bereits nach Abschlufs meiner hier mitzuteilenden Versuche — eben erschienenen Arbeit berichtet Lawrow über eigene Untersuchungen, die zeigen, dafs durch Selbstverdauung von Schweinemagen sich Leucin, Aminovaleriansäure, Putrescin und Kadaverin bilden. Lawrow†††) schliefst daraus, dafs das Pepsin bei längerer Einwirkung die Eiweifskörper ebenso weitgehend wie das Trypsin spaltet. Ich werde am Schlusse meiner im Nachfolgenden mitzu-

*) Lawrow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 26.

**) Kühne, Verhandl. d. naturhistor. Vereins Heidelberg 1876.

***) Neumeister, Lehrbuch d. physiol. Chemie, I. Auflage.

†) S. Fränkel und L. Langstein, Sitzungsber. d. kaiserl. Akademie d. Wissenschaften in Wien 110, II. Abt., 1901.

††) Salaskin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, H. 6.

†††) Lawrow, daselbst 33, H. 3 u. 4.

teilenden Versuche auf die letztgenannte Arbeit Lawrows noch zurückkommen.

II.

Zur Entscheidung der Frage, was für Produkte bei möglichst langdauernder peptischer Verdauung aus Eiweifs entstehen, dienten mir als Ausgangsmaterial etwa 700 g (auf Trockengewicht berechnet) durch Koagulation aus Pferdeblutserum erhaltenes und mit destilliertem Wasser tagelang sorgfältig ausgewaschenes Eiweifs. Dasselbe verdanke ich Herrn Dr. Zunz, der es in einer ungefähr 2 prozentigen Konzentration mit 1 prozentiger Schwefelsäure und Grüblers Pepsin im Wintersemester 1899 bis 1900 zur Verdauung ansetzte. Da Herr Dr. Zunz verhindert war, die Verdauungsflüssigkeit selbst zu untersuchen, ging ich im Februar 1901 auf Wunsch von Prof. Hofmeister an die Untersuchung derselben, also nach ungefähr 12 Monate langer Einwirkung der Pepsinschwefelsäure.

Die Verdauungsflüssigkeit war vollständig klar, aber tief schwarz gefärbt; Albumosen, die durch die Sättigung mit Ammonsulfat bei neutraler Reaktion ausfallen, waren, wie die Untersuchung an einer entnommenen Probe lehrte, nicht vorhanden; beim Ansäuern trat eine leichte Opaleszenz auf. Die Verdauungsflüssigkeit gab die allgemeinen Eiweifsreaktionen und enthielt abspaltbaren Schwefel. Die Biuretreaktion hatte einen prachtvoll roten Farbenton.

Ich will im Folgenden den Gang meiner Untersuchungen mitteilen, wobei ich vorausschicke, dafs das Methodische daran nur in dem zum Verständnis notwendigen Ausmafse Platz finden soll.

Gang der Untersuchung.

Die ungefähr 40 Liter betragende Verdauungsflüssigkeit wurde mit Barytwasser in der Kälte neutralisiert, der überschüssige Baryt durch Durchleiten von Kohlensäure entfernt. Mit dem schwefelsauren Baryum fielen zum gröfsten Teil auch die die Schwarzfärbung der Flüssigkeit bedingenden melaninartigen Substanzen aus, so dafs eine weingelbe Färbung der Lösung resultierte. Diese wurde im Vakuumapparat bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur zu dickem Sirup eingedampft, in dem reichliche Krystallisation auftrat. Die Krystalle wurden jedoch nicht isoliert, sondern es wurde der Sirup durch Lösungsmittel zu fraktionieren

gesucht. Nach mannigfachen Vorversuchen erwies es sich als das Zweckmäfsigste, folgende Fraktionen herzustellen:

I. Eine in kaltem 95 prozentigen Alkohol lösliche Fraktion.
II. Eine in 75 prozentigem kalten Alkohol schwer lösliche (bei langem Stehen sich allmählich abscheidende) Fraktion.
III. Eine in 75 prozentigem Alkohol unlösliche Fraktion.

Fraktion I.

Diese Fraktion wurde weiter getrennt in einen Anteil, welcher in einem Gemenge von 1 Volumen wasserfreien Methylalkohols + 4 Volumina wasserfreien Äthers löslich war (I a), einen in diesem Gemenge nicht, wohl aber in Methylalkohol löslichen Anteil (I b) und in einen in Methylalkohol unlöslichen krystallinischen Rückstand (I c).

I a. Die Methylalkoholätherfraktion hinterliefs nach Abdunsten des Lösungsmittels einen leicht gelb gefärbten Sirup mit zahlreichen eingelagerten teils nadel-, teils kugelförmigen Krystallen. Beim Digerieren des Sirups mit kaltem destillierten Wasser erwiesen sich die Krystalle als darin unlöslich und konnten auf diese Weise leicht isoliert werden. Sie wogen im feuchten Zustand über 1 g, erwiesen sich jedoch unter dem Mikroskop nicht als einheitlich. Die weitere Fraktionierung derselben gelang durch warmen absoluten Äther.

Sofort beim Abkühlen desselben fielen atlasglänzende, stellenweise zu Drusen und Wärzchen vereinigte Nädelchen aus, deren Schmelzpunkt bei 248° lag, die eine äufserst intensive Xanthoproteinreaktion, jedoch keine andere Eiweifsreaktion gaben. In heifsem Wasser bei starker Verdünnung löslich, lösten sie beim Kochen kein Kupferkarbonat, jedoch Kupferoxyd in alkalischer Lösung. Die wässerige Lösung gab mit Bromdämpfen einen Niederschlag, jedoch keine Tryptophanreaktion. Bei der Kalischmelze dieser Krystalle, die sich als stark stickstoffhaltig erwiesen, entwickelte sich ein intensiver skatolähnlicher Geruch.

Beim Abdunsten des Äthers zeigt es sich, dafs derselbe aufser dem eben beschriebenen, in Äther schwer löslichen, Skatol liefernden Körper eine zweite in zarten Kugeln krystallisierende Substanz enthielt, die in allen ihren Eigenschaften mit Leucin identisch war; ihre Menge betrug 0,46 g,

0,139 g gaben 10,435 Proz. N (Dumas); für Leucin berechnet 10,16 Proz.

Der in warmem Äther unlösliche Rückstand der krystallinischen Fraktion wurde im Soxhletschen Extraktionsapparat mit Alkohol ausgezogen, wobei fast der ganze Anteil bis auf dunkelgefärbte Ver-

unreinigungen in Lösung ging; beim Verdunsten des Alkohols schieden sich Krystallkugeln mit strahligem Gefüge aus, die zum Teil das Aussehen eines Osazons darboten; sie waren selbst in siedendem Wasser kaum löslich, reagierten nicht mit Kupferkarbonat, lösten jedoch Kupferoxyd in alkalischer Lösung. Sie erwiesen sich als stickstoffreich, spalteten bei der Kalischmelze kein Skatol ab, gaben die Xanthoprotein- und Millonsche Reaktion sehr intensiv. Aus Aceton liefsen sie sich gut umkrystallisieren. Bei 180° bräunten sie sich und verkohlten bei 210°, ohne zu schmelzen oder zu sublimieren.

0,121 g Substanz gaben 6,98 Proz. N (Dumas).

Zu einer näheren Charakterisierung dieser Substanz fehlte leider die genügende Menge.

Der wasserlösliche Anteil der in Methylalkoholäther löslichen Fraktion — in möglichst wenig Wasser aufgenommen — schied bei mehrwöchentlichem Stehen noch Krystalle ab, die mit den vorher beschriebenen in sämtlichen Eigenschaften übereinstimmten. Von ihnen wurde, als eine weitere Abscheidung nicht mehr erfolgte, abgesaugt; die restierende gelbgefärbte Lösung gab die Xanthoprotein- und Millonsche Reaktion äufserst intensiv, enthielt weder leicht abspaltbaren Schwefel, noch Furfurol liefernde Substanz. Die Biuretreaktion war, wenn auch schwach, positiv. Sowohl durch Phosphorwolframsäure als auch durch Bromdämpfe erfolgte ein dichter Niederschlag; mit Kupferkarbonat gekocht löste die Flüssigkeit davon eine beträchtliche Menge mit tief dunkelblauer Farbe. Keine Andeutung einer Tryptophanreaktion.

Da weder mit Hülfe von Lösungsmitteln noch durch fraktionierte Krystallisation sich eine Isolierung einzelner Produkte erreichen liefs, wurde die gesamte Flüssigkeit bei Anwesenheit eines möglichst geringen Überschusses an Kalilauge unter starker Kühlung benzoyliert. Dabei schied sich in der schwach alkalischen Lösung ein sirupöses Benzoylprodukt aus, das, mit Wasser oft gewaschen, allmählich erhärtete. Um etwa vorhandene Benzoesäure zu entfernen, wurde es mehrmals mit Petroläther ausgekocht, hierauf mit Äther extrahiert, wobei nur ein minimaler Anteil in Lösung ging, der Rest in heifsem absoluten Alkohol gelöst.

Aus der ätherischen gelb gefärbten Lösung krystallisierten kleinste von einem anhaftenden Firnis kaum zu trennende Nadeln, die mit stechendem Geruch verbrannten und sich als auffallend stickstoffreich erwiesen. Da ihre Menge kaum 1 dcg betrug, mufste auf die Analyse verzichtet werden.

Aus der alkoholischen Lösung krystallisierte in prachtvollen

zu Drusen vereinigten Spiefsen ein Benzoylprodukt, das sich durch oftmaliges Umkrystallisieren aus heifsem Alkohol, wobei die Löslichkeit in demselben beständig abnahm, in rein weifsen über 1 cm langen Nadeln gewinnen liefs. Diese erwiesen sich als sehr hygroskopisch, schmolzen konstant bei 176 bis 177°.

Die Elementaranalyse der im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Substanz ergab folgende Zahlen:

0,182	g	gab	73,1	Proz. C	7,2	Proz. H
0,176	g	„	72,991	„ C	7,11	„ H
0,142	g	„	10,34	„ N	(Dumas)	
0,1693	g	„	10,29	„ N	(Dumas)	

Daraus berechnet sich der Sauerstoff zu 9,368 resp. 9,679 Proz.

Durch Verseifung der nach Vornahme der Analyse nur mehr geringen mir zur Verfügung stehenden Menge des Benzoylproduktes suchte ich die Muttersubstanz zu gewinnen. Die Verseifung gelang nach mehrstündigem Kochen mit konzentrierter Salzsäure am Rückflufskühler. (Spaltet man kürzere Zeit, so scheidet sich das in der konzentrierteren Salzsäure in Lösung gehende Benzoylprodukt beim Erkalten unverändert wieder aus.) Nach vollständiger Verseifung wurde die Benzoesäure durch oftmaliges Ausschütteln mit Petroläther entfernt, die salzsaure Lösung der Muttersubstanz im Vakuum über Kalk eingedunstet, wobei sie sich in prachtvollen glänzenden Nadeln abschied. Die wässerige Lösung derselben gab mit Phosphorwolframsäure einen dichten mikrokrystallinischen Niederschlag; mit Platinchlorid bildete sich ein in der Kälte ausfallendes, in grofsen Plättchen krystallisierendes Doppelsalz; die Lösung löste kein Kupferkarbonat, jedoch Kupferoxyd in alkalischer Lösung; mit Brom in alkalischer Lösung bildete sich ein Niederschlag; mit Bromlauge oder salpetriger Säure erfolgte keine deutliche Stickstoffabspaltung; ebenso fiel die Hofmannsche Karbylaminreaktion negativ aus. Als wichtigster Befund sei hervorgehoben, dafs beim Kochen mit Natronlauge ein deutlicher Pyridingeruch auftrat.

Aufser den eben besprochenen, bei alkalischer Reaktion ausfallenden liefsen sich noch zwei weitere Benzoylprodukte gewinnen, die nach dem Ansäuern der Benzoylierungsflüssigkeit neben der Benzoesäure ausfielen. Um dieselben zu isolieren, ging ich so vor, dafs ich nach starkem Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure den dabei auftretenden dichten Niederschlag abfiltrierte, wusch und im Vakuum trocknete. Durch wiederholtes Auskochen mit Petroläther wurde die Benzoesäure entfernt, wobei ein nicht zur Krystallisation zu bringender Sirup zurückblieb. Dieser war zum gröfsten Teil ätherlöslich; ein

kleiner in Äther unlöslicher Anteil löste sich in Chloroform und Alkohol. Da es trotz aller Bemühungen nicht gelang, eine Krystallisation zu erzielen, wurden beide Anteile mit konzentrierter Salzsäure verseift; nach dem Abtreiben der Salzsäure mit Wasserdampf krystallisierte als Muttersubstanz des ätherlöslichen Benzoylproduktes reichlich Leucin, während die Charakterisierung der Muttersubstanz des chloroformlöslichen Anteiles nicht gelang, da er sich bei der Spaltung mit Salzsäure unter Bildung schwarzer Produkte zersetzte.

I b. Der methylalkohollösliche Anteil der in 95prozentigem Alkohol löslichen Verdauungsprodukte wog in getrocknetem Zustand ungefähr 100 g. Die wässerige Lösung desselben zeigte eine intensiv rote Biuretreaktion, Xanthoprotein- und Millonsche Reaktion, enthielt nur Spuren abspaltbaren Schwefels; die Reaktion nach Molisch war deutlich vorhanden. Besonders ausgezeichnet war diese Fraktion durch ihr beträchtliches Lösungsvermögen für Kupferkarbonat, was auf die reichliche Anwesenheit von Aminosäuren hinwies. Als zweckdienlich zur Isolierung von krystallinischen Produkten und deren Charakterisierung in dieser Fraktion erwies sich die Fällung mit Metallsalzen. Zu diesem Behuf wurden durch Kochen der wässerigen Lösung mit Kupferoxyd erst die Kupferverbindungen der vorliegenden Substanzen hergestellt und diese durch Fällung mit neutralem Bleiacetat, Quecksilberacetat und Quecksilbernitrat fraktioniert; Niederschläge und Filtrate wurden durch Schwefelwasserstoff zerlegt und weiter verarbeitet.

Der durch Bleiacetat erzeugte Niederschlag war äufserst gering, doch war die Bleifällung insofern von Nutzen, als die geringen anwesenden Mengen des Furfurol liefernden Körpers, wie auch die Verunreinigung mit der an locker gebundenem Schwefel reichen Substanz dadurch beseitigt wurden.

Aus dem durch Quecksilberacetat hervorgerufenen, ebenfalls spärlichen Niederschlag liefs sich nach dessen Zerlegung durch Benzoylierung bei schwach alkalischer Reaktion ein krystallinisches Benzoylprodukt gewinnen, das in Eigenschaften und Schmelzpunkt mit dem Benzoylprodukt des aus der ätherischen Lösung gewonnenen Pyridinkörpers übereinstimmte. Die in dieser Fraktion erhaltene Menge war sehr gering.

Während in den durch Bleiacetat und Quecksilberacetat erhaltenen Fraktionen nur ganz geringe Mengen Kupferkarbonat lösender Aminosäuren vorhanden waren, enthielt der durch Quecksilbernitrat erzeugte Niederschlag und dessen Filtrat die Hauptmenge derselben. Beim Eindunsten der Lösung des durch Quecksilbernitrat erzeugten, mit Schwefelwasserstoff zerlegten Niederschlages krystallisierten reichlich Substanzen, die jedoch durch Lösungsmittel weder voneinander noch von der Muttersubstanz getrennt werden konnten.

Um zu einer Isolierung zu gelangen, wurde die Benzoylierungsmethode angewandt, und zwar die eine Hälfte mit Kalilauge und Benzoylchlorid, die zweite mit Benzoylchlorid und Natriumbikarbonat verestert. Letztere Methode wurde von Emil Fischer anläfslich seiner Untersuchungen über die Aminosäuren angewandt und hat sich zur Isolierung und Charakterisierung derselben äufserst brauchbar erwiesen.

Bei Benzoylierung mit Kalilauge fiel sofort ein krystallinisches Produkt aus, das aus heifsem Alkohol leicht umkrystallisiert werden konnte, indem es beim Erkalten desselben in prachtvollen langen Nadeln ausfiel.

Im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, schmolzen die Krystalle konstant bei 168°. Die Elementaranalyse ergab folgende Zahlen:

0,1274 g	gab	76,43	Proz. C	5,401	Proz. H
0,1012 g	„	76,49	„ C	5,471	„ H
0,0943 g	„	4,096	„ N	(Dumas)	
0,1032 g	„	4,073	„ N	(Dumas).	

Berechnet für $C_8H_9(C_7H_5O)_2NO$:	Gefunden:
76,51 Proz. C	76,46 Proz. C
5,5 „ H	5,43 „ H
4,05 „ N	4,08 „ N
13,91 „ O	14,03 „ O

Mit Rücksicht darauf, dafs dieses Benzoylprodukt in allen seinen Eigenschaften wie auch in der Zusammensetzung mit Dibenzoyloxyphenyläthylamin übereinstimmt, welches kurz zuvor im hiesigen Institut von Emerson bei Untersuchung der Pankreasverdauungsprodukte dargestellt worden war*), kann es nach Obigem keinem Zweifel unterliegen, dafs Oxyphenyläthylamin bei der peptischen Verdauung gebildet wird, wenn ich es mir auch leider aus Mangel an Material versagen mufste, durch Verseifung die Base selbst herzustellen.

Die Lösung des mit Natriumbikarbonat benzoylierten Anteils wurde, nachdem von dem bei alkalischer Reaktion ausgefallenen Benzoylprodukte abfiltriert war, mit konzentrierter Salzsäure bis zum Auftreten eines dichten Krystallbreies angesäuert, im Vakuum bei niederer Temperatur eingeengt und über Nacht auf Eis stehen lassen. Hierauf wurde die reichlich ausgeschiedene Krystallmasse abgesaugt, getrocknet, die Benzoesäure mit Petroläther ent-

*) Vergl. vorstehende Mitteilung.

fernt, wobei eine spärliche Menge eines krystallinischen Produktes übrig blieb. Dieses wurde aus heifsem Wasser umkrystallisiert; es schied sich in Plättchen und Nadeln aus, die jedoch keinen konstanten Schmelzpunkt zeigten. Bei einer Temperatur von 70 bis 90° getrocknet ergab das Präparat folgende Werte:

0,163 g	gab	57,38 Proz.	C	5,39 H
0,191 g	„	57,41 „	C	5,34 H
0,194 g	„	5,72 „	N	(Dumas)
0,201 g	„	5,68 „	N	

Gefunden:	Es berechnet sich für Benzoylglutaminsäure $C_{12}H_{13}NO_5$:
57,395 Proz. C	57,37 Proz. C
5,065 „ H	5,18 „ H
5,71 „ N	5,58 „ N

Es lag demnach Benzoylglutaminsäure vor; für die Inkonstanz des Schmelzpunktes bin ich nicht im stande eine Erklärung zu geben; ebenso mufste es befremden, die Glutaminsäure in dieser Fraktion zu finden.

Das Filtrat des durch Quecksilbernitrat erzeugten Niederschlages enthielt zum gröfsten Teil Leucin. Es liefsen sich wenigstens nach dreimaligem Umkrystallisieren über 30 g Leucinkupfer gewinnen, das durch die Elementaranalyse identifiziert wurde.

Ic. Die im Methylalkohol unlöslichen Krystalle lösten sich leicht in Ammoniak und krystallisierten aus demselben in schneeweifsen Nadeln. Ihre Menge betrug $2^1/_4$ g. Durch die Millonsche und Piriasche Reaktion wurden sie als Tyrosin identifiziert.

Die Analyse ergab:	Für Tyrosin berechnet:
C = 59,59 Proz.	C = 59,6 Proz.
N = 7,63 „	N = 7,73 „

Fraktion II.

Diese bildete nach dem Abdunsten des Alkohols einen gelbbraunen Sirup. Seine Quantität war nur gering. Auffallend war sein reichlicher Gehalt an abspaltbarem Schwefel. Die allgemeinen Eiweifsreaktionen waren sämtlich vorhanden. Bei fraktionierter Fällung mit Quecksilberacetat, Quecksilberchlorid und Quecksilbernitrat liefs sich der an abspaltbarem Schwefel so reiche Körper in den durch Sublimat ausgefällten Niederschlag koncentrieren. Cystin und Cysteinreaktionen fielen negativ aus. Die Natur dieses Schwefelkörpers, der auch nicht mit Benzylchlorid reagierte, ist daher weiterer Untersuchungen bedürftig. Aus dem Filtrat des Quecksilbernitratniederschlages liefs sich $^1/_2$ g Tyrosin durch Krystallisation gewinnen.

Fraktion III,

der in 75prozentigem Alkohol unlösliche Anteil, bildete einen braunschwarzen Sirup, der neben den allgemeinen Eiweifsreaktionen auffallend stark die Reaktion nach Molisch gab. Pentosenreaktion war nicht vorhanden, Reduktion von Fehlingscher Lösung gering aber deutlich. Eine kleine Probe in Wasser gelöst gab mit Phenylhydrazin und Essigsäure ein Osazon vom Aussehen und den Eigenschaften des Glukosazons. Bei langdauernder Einwirkung von Pepsinsalzsäure auf Bluteiweifskörper wird demnach ein einfaches Kohlehydrat abgespalten. Über die Natur desselben geben die im Folgenden mitzuteilenden Befunde einigen Aufschlufs.

Die Fraktion liefs sich in einen in kaltem Wasser leicht löslichen (a) und einen darin schwer löslichen Anteil (b) zerlegen.

III a. Der leicht in Wasser lösliche Anteil wurde durch Zusatz von Bleiessig bei neutraler Reaktion und durch ammoniakalische Bleilösung in zwei Fraktionen zerlegt.

1. Die durch Bleiessig gefällte Fraktion war ausgezeichnet durch eine tiefdunkelviolette Reaktion mit α-Naphtol und Schwefelsäure und durch Eigenschaften, die auf die Anwesenheit einer Säure schliefsen liefsen. Es liefsen sich durch Kochen mit Calcium- und Kupferkarbonat durch Alkohol fällbare Salze herstellen. Reduktionsvermögen für Fehlingsche Lösung war nicht vorhanden — weder vor noch nach Säurespaltung —, dagegen wurde ammoniakalische Silberlösung kräftig reduziert. Die Eiweifsreaktionen waren positiv, wenn auch nicht sehr intensiv. Dafs durch Bleiessig mindestens zwei Substanzen ausgefällt wurden, liefs sich durch Phosphorwolframsäurefällung zeigen, indem nur der Biuretreaktion gebende Körper als Phosphorwolframat ausgefällt wurde, während die Furfurol liefernde, ammoniakalische Silberlösung reduzierende Substanz in das Filtrat überging. Eine Trennung dieser beiden Substanzen gelang nach zwei verschiedenen Methoden.

Kochte man nämlich die wässerige Lösung mit Kupferkarbonat und fällte bei schwach alkalischer Reaktion durch Alkohol, so blieb die Kupferverbindung des Biuretkörpers im Alkohol gelöst, während das Kupfersalz der ausgesprochen sauren, Furfurol liefernden Subtanz durch den Alkohol als graublauer Niederschlag ausgefällt wurde. In analysenfähiger krystallinischer Form

erhielt ich die Kohlehydratsäure als Benzoylprodukt. Zur Darstellung desselben wurde sie in ihr Kalksalz und aus diesem durch Kaliumkarbonat in ihr Kalisalz übergeführt, dann mit Kalilauge und Benzoylchlorid verestert. Das Benzoylprodukt, in heifsem absoluten Alkohol löslich, fiel beim Erkalten anfangs amorph, nach sechsmaligem Umkrystallisieren bei ganz allmählichem Erkalten schliefslich in doppeltbrechenden Krystallkugeln aus.

Die Analyse dieses Präparates, im Vakuum bei 40° getrocknet, ergab folgende Werte:

0,206 S. enthielten	58,17	Proz.	C	5,24 Proz.	H (mit Chromat verbrannt)
0,198 S. „	58,097	„	C	5,21 „	H
0,158 S. „	2,447	„	N		
0,173 S. „	2,41	„	N		

Die Substanz wies jedoch noch einen Aschegehalt von ungefähr 6 Proz. auf. Da derselbe bei der Homogenität des zur Analyse gelangenden Materials unmöglich auf Verunreinigungen bezogen werden konnte, die qualitative Untersuchung der Asche hauptsächlich Kalium ergab, so ist die Annahme nicht unwahrscheinlich, dafs das Kaliumsalz der benzoylierten kohlehydrathaltigen Säure vorlag.

Der Biuretreaktion gebende Körper konnte wegen Mangels an Material nicht zur Analyse gebracht werden. Er bildete ein amorphes, in Alkohol unlösliches, in Eisessig leicht lösliches Benzoylprodukt.

2. Die durch ammoniakalisches Blei gefällte Fraktion war sehr reichlich. Durch Schwefelwasserstoff zerlegt, zeigte die Lösung eine gelbe Farbe. Xanthoprotein-, Millonsche Reaktion, Bromfällung fehlten gänzlich, Biuretreaktion war nur andeutungsweise vorhanden. Auffallend stark war die Reaktion nach Molisch. Pentosenreaktion negativ, schwache Reduktion von Fehlingscher Lösung, die durch Spalten mit konzentrierter Säure sehr intensiv wurde.

Es konnte nach diesen Reaktionen keinem Zweifel unterliegen, dafs die Lösung vorwiegend ein komplexes Kohlehydrat enthielt, das nur wenig durch eine die Biuretreaktion gebende Substanz verunreinigt war. Um das Kohlehydrat in analysenfähiger Form zu erhalten, wurde die Lösung im Vakuum möglichst konzentriert, hierauf mit einem grofsen Überschufs von Alkohol versetzt. Dabei fiel die Substanz in weifsen Flocken aus, die jedoch äufserst hygroskopisch waren und an der Luft sofort zu einer braunen Schmiere zerflossen. Nur durch schnelle Manipulation unter Anwendung von ganz absolutem Alkohol und Äther und Arbeiten im Vakuum liefs sich die Substanz schliefslich als

weifsgelbliches Pulver gewinnen, von dem Portion I noch mit dem Biuretkörper leicht verunreinigt war, während Portion II durch oftmaliges Umfällen gänzlich frei davon erhalten wurde. Die Substanz bräunte sich bei ungefähr 170°, ohne zu schmelzen. Die Analyse von Portion I ergab folgende Werte:

0,184 g enthielten 42,49 Proz. C und 7,61 Proz. H
0,209 g „ 42,55 „ C und 7,58 „ H
0,151 g „ 8,41 „ N (Dumas)
0,163 g „ 8,506 „ N

Analyse von Portion II:

0,1772 g enthielten 42,28 Proz. C und 7,36 Proz. N
0,149 g „ 8,33 „ N (Dumas)

Gefunden im Mittel:	Es berechnet sich für ein Dihexosamin $C_{12}H_{22}N_2O_9$
C = 42,44 Proz.	C = 42,34 Proz.
H = 7,59 „	H = 7,59 „
N = 8,41 „	N = 8,23 „ .

Bei der Spaltung der Substanz mit konzentrierter Salzsäure erhielt ich einen stark Fehlingsche Lösung reduzierenden Körper, der ein typisches Osazon vom Aussehen und Schmelzpunkt des Glukosazons gab. Bei der Benzoylierung konnte ein krystallinisches Produkt erhalten werden, das jedoch in seinen Eigenschaften keine Übereinstimmung mit Benzoylchitosamin zeigte. Da sein Schmelzpunkt nicht konstant war, kann ich über die Natur dieses einfachen Kohlehydrates nichts weiter aussagen.

Nachdem durch die kombinierte Fällung mit Bleiessig und ammoniakalischem Blei die Kohlehydrate aus dem alkoholunlöslichen Teil entfernt waren, wurde das Filtrat der Bleiniederschläge nach Zersetzung mit Schwefelwasserstoff durch Alkohol gefällt. Nach dreimaligem Lösen des Niederschlages in Wasser und Versetzen mit Alkohol bis zu einer Konzentration von 80 Proz., erhielt ich eine schneeweifse alkoholunlösliche Masse, die, im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, ein blendend weifses hygroskopisches Pulver darstellte. Eine kleine Probe, in Wasser gelöst, gab eine prachtvolle Biuret- und äufserst intensive Xanthoproteinreaktion; Millonsche wie auch jede Furfurolreaktion waren negativ, weder abspaltbarer noch festgebundener Schwefel war nachweisbar. Die Menge dieses Pulvers betrug lufttrocken kaum 3 g. Es stellte ein Gemenge von mindestens drei Substanzen dar. Diese liefsen sich durch Quecksilberchlorid- und Quecksilbernitratfällung voneinander trennen.

a) In den Quecksilberchloridniederschlag, der sehr spärlich war,

ging ein Körper über, der eine wasserklare Lösung bildete und von sämtlichen Eiweifsreaktionen nur eine äufserst intensive Xanthoproteinreaktion darbot. Er erwies sich als fällbar durch Phosphorwolframsäure, das Phosphorwolframat war in warmem Wasser löslich; durch Pikrinsäure und Jodquecksilberkalium war das Produkt nicht fällbar. Die möglichst konzentrierte Lösung, in der Hitze mit Alkohol bis zu hoher Konzentration versetzt, liefs die Base beim Erkalten in glitzernden, spiefsförmigen Nadeln ausfallen. Beim Eindunsten der wässerigen Lösung ohne Zusatz von Alkohol bildete die Substanz einen leicht gelb gefärbten Firnis. Auf dem Platinblech verbrannt, erwies sie sich als sehr stickstoffreich; bei der Kalischmelze entwickelte sie reichlich Skatol. Bei der Veresterung mit Benzoylchlorid und Kalilauge bildete sie ein krystallinisches Benzoylprodukt, das, aus Alkohol umkrystallisiert, bei 169 bis 170° schmelzende Nadeln bildete. [Ein Benzoylprodukt von gleichem Schmelzpunkt und ganz ähnlichen Eigenschaften hat Dr. F. Baum im hiesigen Institut aus Pankreasverdauungsgemischen isoliert und analysiert *). Ob es sich um denselben Körper gehandelt hat, mufs noch dahingestellt bleiben.] Auch ein krystallinisches Platinsalz war erhältlich.

b) In den gleich spärlichen Quecksilbernitratniederschlag ging ebenfalls ein basischer Körper ein, der, durch Phosphorwolframsäure fällbar, gar keine Eiweifsreaktion gab, beim Eindunsten seiner wässerigen Lösung einen sich allmählich in Krystallplättchen verwandelnden Firnis hinterliefs. Die wässerige Lösung löste kein Kupferkarbonat, jedoch Kupferoxyd in alkalischer Lösung und liefs, mit Silbernitrat versetzt, den Körper als Silberverbindung ausfallen. Ein charakteristisches Pikrat konnte ich nicht erhalten.

c) Das Filtrat der beiden unter a und b beschriebenen Niederschläge, vom Quecksilber durch Schwefelwasserstoff befreit, enthielt einen Körper, der nunmehr die Biuretreaktion bei Abwesenheit einer jeden anderen Eiweifsreaktion gab.

Um ihn in analysenfähige Form überzuführen, erwies sich folgendes Verfahren als brauchbar. Die stark saure Lösung wurde eine Stunde lang mit Calciumkarbonat gekocht, filtriert, konzentriert und mit Alkohol gefällt. Dabei schied sich die Kalkverbindung des Biuretkörpers in weifsen Flocken ab, die nach dem Absetzen abgesaugt und durch dreimaliges Lösen in möglichst wenig Wasser und Fällen durch Alkohol bis zur Chlor- und Salpetersäurefreiheit gereinigt wurde. Dieses Kalksalz im Vakuum getrocknet, stellte ein blendend weifses, nicht hygroskopisches Pulver dar, das, in Wasser gelöst, von sämtlichen Eiweifsreaktionen nur eine prachtvoll rote Biuretreaktion gab. Die Säure war ferner ausgezeichnet durch ein beträchtliches Lösungsvermögen für Kupferkarbonat.

*) Vergl. Landolt, Zeitschr. f. physiolog. Chemie 28, 210.

Die Analyse des Kalksalzes ergab (bis 40° im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet) folgende Zahlen:

Ca	N	C	H
29,198 Proz.	6,48 Proz.	24,98 Proz.	4,02 Proz.
29,197 „	6,39 „	24,93 „	4,05 „

was ungefähr einer Formel $C_9H_{16}N_2O_9Ca_3$ oder $C_9H_{16}N_2O_{10}Ca_3$ entspräche.

Mit dem restlichen geringen Anteil des analysenfähigen Materials wurde eine Spaltung mit konzentrierter Salzsäure durch 10 Stunden am Rückflufskühler vorgenommen.

Dabei trat eine ganz geringe Gelbfärbung auf. Die Zerkochungsflüssigkeit gab nach dem Abtreiben der Salzsäure durch Wasserdampf mit Phosphorwolframsäure einen Niederschlag. Im Filtrate des Niederschlages wurde auf Monaminosäuren untersucht; nach Entfernung des Phosphorwolframsäureüberschusses löste die Flüssigkeit Kupferkarbonat mit blauer Farbe, aber das Kupfersalz krystallisierte in keiner Weise; Untersuchung auf Glutaminsäure war ebenfalls negativ.

IIIb. Der wasserunlösliche Anteil der Fraktion III enthielt ungefähr 1 g Tyrosin und schwarz gefärbte Körper vom Typus der Melanine; dieselben gaben bei der Kalischmelze Indolgeruch.

III.

Ein Überblick über die mitgeteilten Untersuchungen ergiebt, dafs sich bei langdauernder peptischer Verdauung ähnliche einfache Substanzen bilden, wie sie durch tryptische Verdauung, nur in viel kürzerer Zeit, abgespalten werden.

Es geht daraus hervor, dafs die Unterschiede zwischen Magen- und tryptischer Verdauung keineswegs so prinzipieller Natur sind, wie man bis vor kurzem anzunehmen geneigt war. Ein Punkt darf dabei allerdings nicht aufser acht gelassen werden. Aus den Untersuchungen Glaessners*) über die Magenprofermente geht die Anwesenheit eines bis zur Tryptophanreaktion verdauenden, hauptsächlich im Pylorusteil des Magens vorhandenen Fermentes hervor, des „Pseudopepsins“. Eine Verunreinigung des Pepsins mit diesem würde das Auftreten der Aminosäuren bei langdauernder peptischer Verdauung erklären können, ohne dafs das Pepsin im alten Sinne daran beteiligt zu sein brauchte. Es ist dies eine Erwägung, die mehr noch für Lawrows Untersuchungen als für die meinigen zu Recht besteht, da Lawrow

*) K. Glaessner, diese Beiträge, 1, 24.

ganze Schweinemagen der Verdauung unterwarf, während ich mit einem käuflichen Pepsin arbeitete und Tryptophanreaktion in meinem Verdauungsgemisch gänzlich vermifste.

Halte ich es auch für unwahrscheinlich, dafs die Bildung so grofser Mengen von Aminosäuren auf die Rechnung des Pseudopepsins allein kommt, so mufs dieser selbst gemachte Einwand doch erst durch Verdauung mit reinstem Pepsin entkräftet werden, das wir ja nach der von Glaessner ausgearbeiteten Methode herstellen können. Untersuchungen in dieser Richtung sind in Hofmeisters Institut im Gange.

Sieht man von dieser noch schwebenden Frage ab, so kann man auf Grund meiner Erfahrungen den bisher beschriebenen, durch Pepsinverdauung aus Eiweifs entstehenden Endprodukten (Leucin, Leucinimid, Aminovaleriansäure, Asparaginsäure, Putrescin und Kadaverin) noch die folgenden genauer charakterisierten anreihen: Glutaminsäure, Tyrosin, Oxyphenyläthylamin, einen Pyridin abspaltenden Körper, eine Kohlehydratsäure, ein Dihexosamin und eine Biuretreaktion gebende Säure. Daneben konnte noch die Anwesenheit aromatischer, zum Teil Skatol liefernder Substanzen, eines locker gebundenen Schwefel enthaltenden Körpers und basischer stickstoffreicher Stoffe nachgewiesen werden.

Von den neugefundenen Stoffen zeigt die Anwesenheit des Oxyphenyläthylamins, dafs unter den gegebenen Bedingungen die Eiweifsspaltung über die der Säurespaltung gesetzten Grenzen hinausgeht (s. Emersons vorstehende Untersuchung). Das Auftreten dieser Base erklärt zum Teil die von Zunz gemachte Beobachtung*), dafs die stickstoffhaltigen nicht mehr Biuretreaktion gebenden Stoffe bei langer Verdauung teilweise in durch Phosphorwolframsäure fällbare Produkte übergehen. Im vorliegenden Falle giebt Tyrosin das durch Phosphorwolframsäure fällbare Oxyphenyläthylamin. Von grofsem Interesse dürfte die weitere Untersuchung des Pyridinkörpers und der Skatol liefernden Substanzen sein.

Auch die weitere Untersuchung der abgespaltenen Kohlehydrate verspricht wichtige Aufschlüsse. Ist doch die fermentative Abspaltung wohl das mindest eingreifende Verfahren zu deren Isolierung. Von den gefundenen hierher gehörigen Verbindungen erinnert die „Kohlehydratsäure“ in ihrem chemischen Verhalten und in dem Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff an das

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 28, 171.

Chondrosin, beziehungsweise an den von Leathes*) aus dem Paralbumin isolierten Kohlehydratkomplex. Wir müfsten dann annehmen, dafs bei der Veresterung mit Benzoylchlorid zwei Benzoylgruppen eingetreten sind. Das durch ammoniakalisches Blei ausgefällte Kohlehydrat von der Zusammensetzung eines Dihexosamins überrascht durch seine Ähnlichkeit mit dem „tierischen Gummi". Auch das von S. Fränkel **) aus dem Ovalbumin dargestellte „Albamin" stimmt in seiner Zusammensetzung fast vollständig mit dem vorliegenden stickstoffhaltigen Di- oder Polysaccharid überein. Interessant ist der Befund an dieser Stelle insbesondere mit Rücksicht auf das Vorkommen des von Baisch ***) und anderen nachgewiesenen „tierischen Gummis" im Harn. Über die Natur des zugrunde liegenden einfachen Kohlehydratkomplexes kann ich vorläufig nichts Näheres aussagen Ob es sich um Chitosamin oder ein anderes stickstoffhaltiges Kohlehydrat handelt, müssen weitere Untersuchungen lehren.

Da das zur Verdauung gelangte Bluteiweifs ein Gemenge mehrerer Eiweifskörper darstellt, so ist eine sichere Beantwortung der Fragen nach der Zugehörigkeit der isolierten Kohlehydrate zu bestimmten Blutproteiden nicht möglich; immerhin erlauben meine bisher vorliegenden Untersuchungen über die Kohlehydratkomponenten der letzteren einen Schlufs in der Richtung, dafs die Annahme der Abstammung der Kohlehydratsäure aus dem Serumalbumin †) gerechtfertigt erscheint.

Beachtenswert erscheint mir endlich der Nachweis eines die Biuretreaktion gebenden ausgesprochen sauren Körpers. Dieser würde sonst nach seinen Eigenschaften als Pepton angesprochen worden sein. Bei dem Dunkel jedoch, das noch über dieser Körpergruppe schwebt, ist vorläufig der Versuch einer Identifizierung mit einer der unter diesem Namen beschriebenen Substanzen aussichtslos. Von Wichtigkeit ist jedoch die sich hierbei ergebende Thatsache, dafs der letzte, einfachste peptonartige Körper nicht eine basische Substanz, ein „Protamin", sondern eine Säure darstellt.

Dafs ich bei meinen Untersuchungen die von Pfaundler gefundenen, in ihrem chemischen Bau zwischen den Peptonen und

*) Leathes, Archiv f. experim. Pathol. u. Pharm. **43**, 1900.

**) S. Fränkel, Aus den Sitzungsberichten der Kaiserl. Akademie der Wissensch. in Wien 1899.

***) Baisch, Zeitschr. f. physiol. Chemie XVIII u. XIX.

†) Langstein, diese Beiträge **1**, 267.

den Aminosäuren stehenden Substanzen vermifst habe, mag einerseits an der viel länger währenden peptischen Verdauung und andererseits daran liegen, dafs ich nur einen kleinen Teil der Spaltungsprodukte identifizieren konnte und mich insbesondere an die durch ihr Krystallisationsvermögen die Gewähr der Reinheit bietenden Körper gehalten habe. Vereinfachen wird sich das Studium dieser Spaltungsprodukte durch Anwendung einheitlichen krystallisierten Ausgangsmaterials; ich habe eine Untersuchung dieser Art im Gange und hoffe, über dieselbe in Kürze berichten zu können.

XXXI.

Ueber die Zusammensetzung der Eiweifsstoffe und Zellmembranen bei Bakterien und Pilzen.

Von **K. S. Iwanoff.**

[Aus dem pharmakologischen Laboratorium der Kaiserl. militärmedizinischen Akademie zu St. Petersburg (Dir.: Prof. N. P. Krawkow).]

1. Methodisches.

Seit man die Wichtigkeit der niederen Pilze für pathologische Vorgänge erkannt hat, ist die Frage nach deren chemischer Zusammensetzung sehr oft der Gegenstand von Versuchen gewesen. Da man aber bei der Gewinnung einer zur Analyse genügenden Menge chemisch reiner Substanzen in Anbetracht der Kleinheit dieser Lebewesen auf zunächst fast unüberwindliche Schwierigkeiten stiefs, so beschränkten sich die Untersucher zumeist auf die Ausführung qualitativer Reaktionen an Produkten, die zur Zeit nicht als chemisch gut charakterisierte gelten können, oder sie beschäftigten sich mit umschriebenen Einzelfragen. Erst in der letzten Zeit haben eingehendere Untersuchungen immer deutlicher gezeigt, dafs Nukleinkörper an der Zusammensetzung des Pilz- und Bakterienprotoplasmas sehr wesentlichen Anteil haben, sowie dafs die Pilz- und Bakterienzellwände nicht, wie man früher annahm, Cellulose, sondern Chitin oder eine chitinähnliche Substanz enthalten. Der Widerspruch, in dem diese Befunde, auf die ich weiter unten eingehe, zu den älteren Angaben stehen, lassen eine Weiterführung dieser Untersuchungen gerechtfertigt erscheinen.

Im Hinblick auf das grofse biologische Interesse der Frage schlug mir Herr Prof. Krawkow vor, die Eiweifsstoffe und Zellmembranen der Pilze und Bakterien nach einem neuen, von ihm

in dieser Richtung bereits erprobten Verfahren eingehender zu untersuchen*).

Das Verfahren von Krawkow schliefst sich im Prinzip der Methode an, welche Schmiedeberg**) zur Isolierung der Chondroitinschwefelsäure aus dem Knorpel benutzte***).

Die möglichst isolierten Bakterien bezw. Pilze werden mit einer konzentrierten Lösung von Kupferacetat behandelt, worin sich die suspendierten Elemente bald absetzen. Nach ein bis zwei Stunden wird die kupferhaltige Flüssigkeit unter stetem Umrühren mit verdünnter Kalilösung versetzt, bis Biuretreaktion eintritt, und das Gemisch 12 bis 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen; dann wird die klare, ausgeprägte Biuretreaktion darbietende Flüssigkeit von dem Niederschlage abgegossen, der letztere neuerdings mit verdünnter Kalilauge angerührt, nach eintägigem Stehen von der überstehenden Lösung wieder durch Dekantation getrennt, und diese Prozedur so oft wiederholt, bis jede Spur der Biuretreaktion in der alkalischen Lösung verschwunden ist. Dazu bedarf es etwa zwei bis drei Wochen.

Die ersten drei abgegossenen alkalischen, starke Biuretreaktion darbietenden Waschwässer dienen zur Darstellung der Eiweifskörper. Sie werden filtriert und mit Essigsäure im Überschufs versetzt, wobei die Eiweifsstoffe als voluminöser flockiger Niederschlag ausfallen, der gründlich mit Wasser ausgewaschen, dann mit Alkohol und Äther ausgezogen, zuletzt bei Zimmertemperatur getrocknet wird.

Der Kupferoxydhydrat enthaltende Niederschlag dient zur Gewinnung der Zellmembranen. Er wird zunächst mit Wasser ausgewaschen, dann in verdünnter Salzsäure oder Essigsäure gelöst, wobei neben Kupferoxydhydrat Hemicellulosen und in Wasser lösliche Kohlehydrate in Lösung gehen, die unlöslichen Anteile der Membranen aber zurückbleiben. Man wäscht dieselben durch Dekantation bis zum Verschwinden der Kupferreaktion, behandelt dann mit Alkohol, dessen Konzentration allmählich gesteigert wird,

---

*) Die nachstehenden Untersuchungen wurden vorläufig in der Sitzung der Gesellschaft der Naturforscher zu St. Petersburg vom 15. Nov. 1900, ausführlicher in der Sitzung der Gesellschaft der russischen Ärzte zu St. Petersburg vom 17. April 1901 mitgeteilt.

**) Archiv f. experim. Path. u. Pharm. 28, 354.

***) Das Verfahren wurde von Herrn Prof. N. Krawkow in der Sitzung der Gesellschaft russischer Ärzte zu St. Petersburg im November 1899 vorgeschlagen, dann im Wratsch 1901, Nr. 36 veröffentlicht.

sammelt auf dem Filter, erschöpft im Soxhletapparat mit Äther und trocknet bei Zimmertemperatur.

Dies sind die Grundzüge des angewandten Verfahrens. Über Einzelheiten soll bei Wiedergabe der Versuche weiter unten berichtet werden.

In meinen Versuchen gelangten zur Untersuchung von Pilzen: Aspergillus niger, Boletus edulis (Fruchtkörper), Claviceps purpurea (Sclerotien), von Bakterien: Bacillus Megatherium, Bacillus Anthracis, Staphylococcus pyogenes aureus.

1. Aspergillus niger. Die Konidien wurden auf in flachen Glasgefäßen befindliche sterilisierte Raulinsche Flüssigkeit ausgesäet, jedesmal auf etwa 15 Liter der Lösung. Die Kulturen wurden im Thermostaten bei 28 bis 30° gehalten. Nach zwei bis drei Tagen erhielt man ein kräftiges, dicht verflochtenes Mycelium von fast knorpeliger Konsistenz. Die Myceliumernte sammelte ich vor der Konidienbildung, wusch sorgfältig mit Wasser, preßte ab, zerkleinerte sie mit der Schere. Die fein zerschnittene Masse wurde in kleinen Portionen mit Krystallen von essigsaurem Kupfer im Porzellanmörser zu einem gleichmäßigen Brei verrieben, in dem man mikroskopisch nur sehr kleine Hyphenreste bemerken konnte. Nach Zusatz von Wasser brachte ich die ganze Masse in größere Schalen und ließ dieselbe behufs gründlicher Durchtränkung mit Kupferacetat 24 Stunden stehen. Am folgenden Tage begann ich die Behandlung mit Ätznatronlösung (resp. Ätzkali), die zwei Wochen dauerte, dann wusch ich den Niederschlag fünf bis sechs Tage mit Wasser, löste das Kupferoxydhydrat mit verdünnter Salzsäure auf und brachte die mit Wasser durch zehn bis zwölf Tage gewaschenen Zellhäute aufs Filter, worauf sie mit Alkohol und Äther ausgezogen, getrocknet, im Porzellanmörser zerrieben und zwölf Stunden im Soxhletapparat extrahiert wurden. Ich erhielt die Membranen aus drei Kulturen in Form eines gleichmäßig feinen Pulvers, das graugelblich oder zimtbräunlich gefärbt war. Mikroskopisch untersucht zeigte es hohle Zelltrümmer oder kleine Myceliumreste. Die erhaltene Quantität betrug 40 bis 50 g.

Die Eiweißstoffe fällte ich aus den drei ersten Waschwässern durch überschüssige Essigsäure, der Niederschlag wurde 14 bis 16 Tage gewaschen. Nach Alkohol- und Ätherbehandlung stellte er ein hellgelbes oder zimtbraunes Pulver dar.

2. Boletus edulis. Die besten getrockneten Handelspilze wurden auf der Kaffeemühle gemahlen, dann im Porzellanmörser fein gepulvert und im Soxhletapparate 30 Stunden mit Äther extrahiert. Das entfettete Pulver behandelte ich, wie oben bei Aspergillus niger beschrieben ist.

Die Membranen stellten ein weißlichgraues, etwas ungleichmäßiges Pulver dar, aus kleinsten verschiedenfarbigen Stäubchen bestehend. Mikroskopisch fanden sich darin die Bestandteile des Parenchyms des Fruchtkörpers, der sporenbildenden Schicht und der pigmentierten Ober-

fläche des Hutes. Die Eiweifsstoffe wurden als rotbräunliches Pulver erhalten.

3. Claviceps purpurea. Die reifen Sklerotien wurden nach dem bei Boletus beschriebenen Verfahren behandelt. Die Biuretreaktion der alkalischen Lösung hatte eine stark purpurrote Farbe (wie bei Peptonen) und die Oberfläche des Niederschlages von Kupferhydroxyd bedeckte sich in den ersten Tagen mit einer ziegelroten Lage von Kupferoxydul. Die gereinigten Eiweifsstoffe waren von schwarzbrauner Farbe, bei dem Trocknen verwandelten sie sich in ein tief zimtbraunes Pulver. Die Membranen erhielt ich nur als grobkörniges, aus Sklerotienstückchen (bis $^1/_2$ mm dick) bestehendes Pulver; darum benutzte ich sie nur zur Gewinnung der Zersetzungsprodukte.

4. Bacillus Megatherium wurde in 15 Literkolben von Fleischextraktnährbouillon monatelang bei + 30° C. kultiviert. Mikroskopisch liefsen die Kulturen junge Stäbchen, sporenbildende Bacillen, reife Sporen und Involutionsformen (in minimaler Menge) erkennen. Die klare Kulturflüssigkeit wurde vorsichtig vom Bacillenbodensatz abdekantiert, der Rest durch die Chamberlandkerze abfiltrirt; der Bakterienniederschlag wurde mit konzentrierter Lösung von Kupferacetat versetzt und nach der gewöhnlichen Methode weiter behandelt. Die reine sterilisierte Kulturbouillon vor Impfung mit Bac. Megatherium hatte keinen Niederschlag mit überschüssiger Essigsäure gegeben; nach erfolgter Bakterienentwickelung konnte man beim Ansäuern eine minimale feinflockige Fällung (häufig nur eine Opaleszenz) erhalten, die wahrscheinlich durch partielle Lösung der Eiweifssubstanzen der Bakterien in der Bouillon bedingt war.

Die erhaltenen Eiweifskörper sind rein hellgelblich gefärbt, die Zellhäute leicht bräunlich. Mikroskopisch bestehen die letzteren aus Bakterientrümmern, Sporen, manchmal findet man auch gut erhaltene hohle Bakterienfäden.

5. Bacillus Anthracis. Die Behandlung war die bei Bac. Megatherium beschriebene. Mikroskopisch bestand das Präparat der Membranen aus Zellhäuten von Sporen und sporenhaltigen Bacillen. Es war schwarzbraun, das Eiweifspräparat zimtbraun oder hellgelb gefärbt.

6. Staphylococcus pyogenes aureus wurde auf der Oberfläche von 2 proz. Nähragar kultiviert, vorsichtig mit der Platindrahtöse in die Kupferlösung gebracht, dann nach gewöhnlichem Verfahren weiter behandelt. Die Eiweifsstoffe stellten ein zimtbraunes, die Membranen ein dunkelbraunes Pulver dar.

Nach diesen Bemerkungen gehe ich zur Beschreibung der Eigenschaften der Produkte und zu den Analysenergebnissen über.

2. Die Eiweifsstoffe.

Die von sämtlichen untersuchten Arten erhaltenen Eiweifssubstanzen sind in Wasser, Salzlösungen und verdünnten Säuren unlöslich, leicht dagegen löslich in verdünnten Alkalien und Am-

moniak, ja auch in konzentrierten Säuren; beim Erhitzen riechen sie nach verbranntem Horn; alle geben recht ausgeprägte Biuretreaktion, werden aus alkalischer Lösung durch Neutralisation oder Überschufs von Essigsäure (resp. Mineralsäuren) gefällt, insbesondere in Gegenwart einer minimalen Menge von Salzen der Schwermetalle (Ag, Cu, Fe, Hg, Pt, Au), ferner von Ferrocyankalium, von Tannin, Pikrinsäure, Alkohol, Äther und von einem Überschufs von schwefelsaurem Ammon oder Magnesium. Beim Erwärmen mit konzentrierter Lauge spalten sie Schwefel ab, der auf Säurezusatz als Schwefelwasserstoff entweicht.

Die 1 Promille Alkali enthaltende Lösung des Eiweifses von Aspergillus niger und Bac. Megatherium bleibt im Thermostaten zwei Wochen krystallklar und frei von Fäulnis. Eine kleine Menge von Aspergilluseiweifs zu einer Kultur von Bac. pyocyaneus gefügt, schädigt merklich das Wachstum derselben.

Von allen erhaltenen Eiweifspräparaten, ausgenommen Staphylokokkus, wo die Quantität nicht reichte, wurde Stickstoff-, Phosphor- und Schwefelgehalt, bei Aspergillus niger auch Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt bestimmt.

Die Stickstoffbestimmung geschah nach Dumas, die C- und H-Bestimmung durch Verbrennen der mit gepulvertem chromsauren Blei gemischten Substanz im offenen Rohre im Porzellanschiffchen. Schwefel und Phosphor wurden nach Schmelzen mit kohlensaurem Natron und salpetersaurem Kali bestimmt: der Schwefel als schwefelsaures Baryum, der Phosphor als pyrophosphorsaures Magnesium gewogen.

Die Ergebnisse der Elementaranalysen sind in folgender Tabelle zusammengestellt*):

Die Eiweifsstoffe von	C Proz.	H Proz.	N Proz.	P Proz.	S Proz.	Asche Proz.
Bac. Megatherium . . .	—	—	16,32	1,85	2,10	1,74
„ Anthracis I	—	—	16,27	2,16	1,95	2.50
„ „ II	—	—	16,00	2,25	—	2.95
Bac. pyocyaneus (nach N. Krawkow)	52,73	6,91	16,50	2,11	1,00	2.25
Aspergillus niger I . . .	52,58	7,60	15,66 15.74	0,84	1,21 1.12	1,00
„ „ II . . .	—	—	15,19	0,99	1,23	1,00
Boletus edulis	—	—	15,84—15,64	1,08	2,14	2,23
Clav. purpurea (Sklerot.)	—	—	16,23—16,02	0,75	1,77	3,25
Echte Nukleoproteide . .	—	—	14,73—16,86	0,8—2,00	1,0—2,0	—

*) Die Analysen sind auf aschefreie Substanz berechnet.

Auf Grund dieser Zahlen dürfen die untersuchten Eiweifsstoffe, da sie bei einem Stickstoffgehalt von 15 bis 16 Proz. 0,75 bis 2,25 Proz. Phosphor enthalten, als Nukleoproteide angesehen werden.

Die Anwesenheit von Nukleinkörpern in den Bakterien ist schon auf Grund ihrer Tingirbarkeit mit Kernfarbstoffen oft vermutet worden. Festere Anhaltspunkte für die Existenz von Nukleinkörpern gaben nachstehende Beobachtungen:

L. Brieger*) sammelte die Kulturen von Bacillus pneumoniae Friedl. von der Oberfläche der Gelatinestichkulturen; durch Behandeln mit verdünnter Alkalilösung und nachherige Fällung mit Essigsäure erhielt er aus ihnen einen Eiweifsstoff mit allen Nukleoalbuminreaktionen.

Th. Weyl**) stellte aus Tuberkelbacillen einen Eiweifskörper — Toxomucin genannt — dar. Um es abzuscheiden, übergofs er die Bakterienmasse mit verdünnter erwärmter Natronlösung und fällte das Eiweifs mit Essigsäure. Es gab alle Mucinreaktionen, der Elementaranalyse nach enthielt es C 51,6 Proz., H 7,3 Proz., N 4,4 Proz., Schwefel und Phosphor.

T. Nishimura***) wies in einem Wasserbacillus (B.N. 28 Rubner) Xanthin, Guanin und Adenin nach.

G. Galeotti†) untersuchte die Eiweifsstoffe der Tuberkelbacillen und einer dem Bac. ranicidus Ernst sehr ähnlichen Bakterienart. Bei Extraktion mit Alkali und Fällung mit Säure erhielt er einen nach Eigenschaften und dem Verhalten zu Pepsinsalzsäure als Nukleoproteid aufgefafsten Körper, dessen Analyse 12,005 bis 12,15 Proz. N, 0,94 bis 1,83 Proz. P ergab.

E. Klebs††) erhielt bei Pepsinverdauung entfetteter Tuberkelbacillen einen unverdaulichen Rest (Nuklein), welcher zum Teil in alkalischen Flüssigkeiten löslich war und mit überschüssiger Säure ausfiel. Die Analyse des durch mehrmalige Fällung mit Alkohol gereinigten Nukleins ergab an Phosphor 8 bis 9 Proz.

Ruppel†††) fand in zertrümmerten Tuberkelbacillen eine Nukleinsäure, welche er als „Tuberkulinsäure“ bezeichnet. Sie enthält 9,92 Proz. P. Auch er giebt an, dafs sich aus den ausgelaugten Bacillen durch verdünnte Alkalien eine Substanz vom Verhalten der Nukleine gewinnen läfst.

---

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 9, 1.
**) Deutsche medizin. Wochenschr. 1891, S. 256.
***) Archiv f. Hygiene 18, 318.
†) Zeitschr. f. physiol. Chemie 25, 48.
††) Zentralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenk. 20, I, 488.
†††) Zeitschr. f. physiol. Chemie 26, 218.

Die erste vollständige Analyse des Nukleoproteids von Bakterien lieferte N. Krawkow*). Bouillonkulturen von Bac. pyocyaneus wurden mit konzentrierter Kupferacetatlösung gefällt, dann mit verdünntem Ätznatron behandelt. In dem alkalischen Auszuge fand er alle Eiweifskörper des Auszugsmaterials. Die Analyse ergab folgende Zusammensetzung: C 52,73 Proz., H 6,91 Proz., N 16,50 Proz., P 2,11 Proz., S 1,0 Proz. In der Asche war eine beträchtliche Menge von Eisenoxyd vorhanden. Nach dem Befunde der Analyse und qualitativen Reaktionen war der gefundene Stoff, welcher aufserdem stark giftig für Frösche und Tauben erschien, ein Nukleoproteid.

Seit der ersten Mitteilung Krawkows liegt noch eine kurze Angabe von Lustig und Galeotti**) vor, wonach sie aus dem Pestbacillus einen Körper von dem Verhalten eines Nukleoproteids isoliert hätten. Erwähnt sei auch, dafs E. Bendix***) in dem von den Tuberkelbacillen durch Ausziehen mit Alkali und Essigsäurefällung erhaltenen Nukleoproteid die Pentosenreaktion mit Orcin nachwies; die gleiche Reaktion erhielt er bei Diphtheriestäbchen, nicht aber beim Typhusbacillus.

Die von mir bei Bac. Megatherium und Bac. Anthracis erhaltenen Werte stimmen, wie die Tabelle zeigt, mit den von Krawkow bei Bac. pyocyaneus erhaltenen Werten überein. Es darf danach auf eine sehr allgemeine Verbreitung der Nukleoproteide bei Bakterien geschlossen werden. Aber auch bei den Hut- und Schimmelpilzen, deren Eiweifsstoffe bisher nicht als Nukleoproteide erkannt worden sind, scheinen sie, nach obigen Resultaten zu schliefsen, regelmäfsig vorzukommen.

Dagegen mufs ich mich hinsichtlich des schwefelfreien Mykoproteins von Prof. Nencki†) und seiner Schule der von T. Nishimura und N. Krawkow ausgesprochenen Meinung anschliefsen, dafs dasselbe ein künstliches Zersetzungsprodukt des Bakterieneiweifses ist, entstanden durch die Wirkung des siedenden Alkalis, das bekanntlich leicht Schwefel aus Eiweifsstoffen abspaltet.

In der Asche der Eiweifsstoffe von sämtlichen untersuchten Bakterien, von Aspergillus niger und Boletus edulis fand ich eine kleine Menge von Eisenoxyd.

In vorläufigen Experimenten erwiesen sich die oben beschriebenen Nukleoproteide bei Einführung unter die Haut von

*) Wratsch 1901, Nr. 36.

**) British med. Journ. 1900, S. 312.

***) Deutsche medizin. Wochenschr. 1901, Nr. 2.

†) Journ. f. prakt. Chemie 20 (N. F.), 443.

Kaninchen, Fröschen und Tauben als stark giftig; sie zeigten auch recht starke pyrogene Wirkung, die für die nahen physiologischen Beziehungen zu Buchners „Proteinen" spricht. Die genauere Untersuchung der physiologischen Wirkung dieser Nukleoproteide hat Prof. N. Krawkow übernommen.

3. Die Zellmembranen.

Die gewonnenen Zellhautpräparate erwiesen sich als in Schweizers Reagens völlig unlöslich, auch bei andauerndem, zwei Tage fortgesetztem Umrühren in einem hermetisch verschlossenen Glase*). In konzentrierter Schwefelsäure quollen sie anfangs auf, wurden durchsichtig und lösten sich zum Schlufs gänzlich; diese Lösung bräunte sich bei Zimmertemperatur infolge von Verkohlung der Substanz. Konzentrierte Salzsäure löste die Membranen in der Kälte nicht vollständig auf. Aus der durch Asbest abfiltrierten Lösung fiel bei Neutralisation mit Alkalien (KHO, NaHO) oder mit Wasser im Überschufs ein weifsflockiger Niederschlag aus, welcher alle qualitativen Reaktionen des tierischen Chitins darbot.

Beim Betupfen des getrockneten Zellhautpulvers mit verdünnter Schwefelsäure, dann mit wässeriger Jodlösung erhielt man eine rotviolette Färbung, ähnlich der vom tierischen Chitin. Mit Chlorzinkjodlösung gelang es, makroskopisch Braunfärbung der Membranen und mikroskopisch leichte Gelbfärbung zu erzielen. Beim Kochen mit 10proz. Schwefelsäure erfolgte Braunwerden der Lösung und nach 10 Minuten auf Zusatz von Kalilösung und Fehlingscher Flüssigkeit starke Reduktion. Eine gleich stark reduzierende Lösung wurde beim Kochen mit Salzsäure erhalten. Die Stickstoffprobe von Lassaigne bewies die Gegenwart von Stickstoff in allen sechs untersuchten Membranpräparaten.

Die Asche enthielt schon dem Aussehen nach eine beträchtliche Menge von Eisenoxyd, was leicht durch die Berlinerblau- und Rhodanreaktion sicherzustellen war. Aufserdem fanden sich in der Asche Kieselsäure, Natrium und Kalium.

Die Elementaranalysen ergaben**):

*) Die Löslichkeit kontrollierte ich durch Neutralisation der klar abfiltrierten Reagenslösung mit überschüssiger Salzsäure. In einer Membranenportion von Aspergillus niger bemerkte ich, dafs ein minimaler Niederschlag ausfiel. Die mikroskopische Untersuchung ergab aber Verunreinigung mit Papierfasern.

**) Die Bestimmung geschah, wie es oben angegeben ist. Die Analysen sind auf aschefreie Substanz berechnet.

Die Zellmembranen von	C Proz.	H Proz.	N Proz.	Asche Proz.
Bacillus Megatherium .	45,98	6,95	8,44	4 44
„ Anthracis . . .	—	—	8,84	3,77
„ pyocyaneus (nach N. Krawkow). . .	46,02	6,70	8,82	—
Chitin	45,69—46,73	5,96—6,60	6,14—10,29	—
Aspergillus niger I . .	46,43—46,55	6,25—6,30	2,47—2,64	0,50
„ „ II . .	46,51	6,01	2,72	0,50
„ „ III . .	—	—	2,88—2,53	0,50
Dieselben mit Schweizers Reagens gereinigt .	—	—	2,79	0,50
Die Membranensubstanz aus konz. HCl gefällt	—	—	7,71	—
Boletus edulis	—	—	2,57—3,56	0,80

Wenn man die Zusammensetzung der Zellhäute der Bakterien mit jener des Chitins vergleicht und die oben angeführten Reaktionen berücksichtigt, so kommt man zur Überzeugung, dafs die Zellmembranen aus einer Substanz bestehen, die dem tierischen Chitin sehr nahe verwandt, wenn nicht mit ihm identisch ist.

Diese Ergebnisse sind geeignet, die wichtigen einschlägigen Befunde anderer Forscher zu bestätigen und zu vervollständigen.

E. Winterstein*) untersuchte eine Anzahl von Pilzen: Boletus edulis, Polyporus officinalis, Agaricus campestris, Morchella esculenta, Cantharellus cibarius, Lactarius sp., Boletus sp., Penicillium und Botrytis. Die feingepulverten und entfetteten Objekte wurden lange Zeit entweder der Maceration in Schulzes und Hoffmeisters Gemisch oder einer Kalibehandlung nach Hoppe-Seyler unterworfen. Der ungelöste, sorgfältig ausgewaschene Rückstand der Membranen wurde gesammelt und analysiert. Ich führe hier nur einen kleinen Teil seiner Ergebnisse an:

	C Proz.	H Proz.	N Proz.
Boletus edulis	42,39—44,59	6,47—6,27	3,89—3.33
Polyporus officinalis . .	43,75	6,46	0,70
Cantharellus cibarius . .	44,87	6,85	2,97
Agaricus campestris . .	44.32	6,64	3,58
Botrytis cinerea	42,08	6,33	3,90
Penicillium glaucum . .	—	—	3,30

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 19, 521. Hier findet sich die ältere einschlägige Litteratur zusammengestellt.

Das erhaltene Membranenmaterial war völlig in Schweizers Reagens und gewöhnlichen Lösungsmitteln unlöslich, konzentrierte Säuren aber lösten vollständig; beim Kochen mit Schwefelsäure und Bestimmung des Zuckers nach Allihn erhielt er bei den einzelnen Arten verschiedene Glykosemengen, von 59,15 Proz. bis 94,72 Proz., der gröfste Gehalt an Glykose fand sich bei den Zellhäuten von Polyp. officinalis, die eine minimale Stickstoffmenge (0,70 Proz.) zeigten. Die Schlufsfolgerungen des Autors sind: die Pilzzellmembranen bestehen nicht aus Cellulose, sondern aus einer stickstoffhaltigen Substanz. Später*) erhielt er durch Erhitzen mit Salzsäure aus den Membranen bei allen untersuchten Pilzen salzsaures Glykosamin. Beim Schmelzen der Membranen mit Ätzkali nach Hoppe-Seyler wurde ein stickstoffhaltiger Körper erhalten, in verdünnten Säuren leicht löslich und nach Reaktionen und Zusammensetzung dem Chitosan analog. Die Versuche, das Chitin rein zu gewinnen, waren ohne Erfolg, Agaricus campestris ausgenommen, dessen gereinigte Membranen einen entsprechenden Stickstoffgehalt (6,29 Proz.) aufwiesen. Bei Boletus edulis erhielt er die Membranen mit 5,27 Proz. Stickstoff, bei Polyporusarten ergab sich die Stickstoffmenge zu 0,28 bis 0,67 Proz.

E. Gilson**) zeigte, dafs die Behandlung der Zellhäute von Pilzen mit konzentrierter Salzsäure und Ätzkali dieselben Zersetzungsprodukte giebt wie das tierische Chitin. Nach Behandeln des feingepulverten Materials von Agaricus campestris mit verdünnter Natronlauge, dann mit Schwefelsäure, Alkohol und Äther erhielt er ein weifses Pulver mit allen Eigenschaften des Chitins. Mit Kali geschmolzen gab es „Mykosin“ (dem Chitosan analog) und mit konzentrierter Salzsäure Glykosamin. Die Elementaranalyse ergab 46,11 Proz. C, 6,98 Proz. H, 6,17 Proz. N; einen ähnlichen Stoff gewann Gilson auch aus anderen Pilzen (Claviceps, Polyporus, Boletus u. s. w.) und er machte auf das Vorkommen eines Kohlehydrats vom Hemicellulosentypus in Pilzzellhäuten aufmerksam. In der ausführlicheren***) Mitteilung beschreibt er die Reindarstellung des Chitins aus Agaricus campestris und Claviceps purpurea, sowie die Reaktionen und Zusammensetzung des Mykosins. Als Mittel aus neun Elementaranalysen von Mykosin ergab sich: 43,62 Proz. C, 7,44 Proz. H, 7,38 Proz. N. Die berechnete empiri-

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 21, 134.
**) Compt. rendus 120, 1000.
***) La Cellule 11, 7.

sche Formel $C_{14}H_{28}N_2O_{10}$, entspricht einem Methylglykosamin, $C_7H_{15}NO_5$. Bei der Einwirkung der konzentrierten Salzsäure erhielt er salzsaures Glykosamin.

Diese Beobachtungen wurden bald auf Bakterien ausgedehnt. C. van Wisselingh*) konnte zwar bei Bakterien ebenso wenig wie bei Saprolegniaceen, Peronosporaceen, Hefen und einigen Myxomyceten mikrochemisch Chitin nachweisen, während ihm das bei den untersuchten Askomyceten, Pyrenomyceten, Basidiomyceten gelang; allein Krawkow**) stellte nach seinem Verfahren aus Bac. pyocyaneus die Membranen als eine stickstoffhaltige, mit Jodschwefelsäure sich rotviolett färbende Substanz dar von der Zusammensetzung 46,2 Proz. C, 6,7 Proz. H, 8,82 Proz. N.

O. Emmerling***) fand in den isolierten Membranen der Zoogläa des Sorbosebakteriums (das er mit Bact. xylinum Brown für identisch hält) 2 bis 3 Proz. N. Endlich erhielt E. Bendix†) durch Kochen von entfetteten Tuberkelbacillen mit Salzsäure eine reduzierende Lösung, die mit Phenylhydrazin ein bei + 153 bis 155° schmelzendes Osazon gab.

Den oben mitgeteilten Analysen zufolge zeigen die Bakterienmembranen direkt die Zusammensetzung des Chitins, während die Membranen von Hut- und Schimmelpilzen, ihrem Stickstoffgehalte nach zu schliefsen, nur zu einem Teil aus chitinartiger Substanz bestehen.

E. Winterstein††) hat bereits bewiesen, dafs man bei den Fruchtkörpern der Hutpilze nur bei tieferem Eingreifen das Chitin von einem damit eng verbundenen, stickstofffreien Komplex, wahrscheinlich einem Kohlehydrate, abtrennen kann. Dieses Kohlehydrat kann man nicht durch Lösen in Schweizers Reagens entfernen, wie sich aus obigen Analysenergebnissen ergiebt. Löst man aber die Membranen in konzentrierter Salzsäure in der Kälte und fällt sie mit Wasser im Überschufs, so enthält der Niederschlag 7,71 Proz. Stickstoff, was dem Stickstoffgehalt des Chitins nahekommt und mit der Beobachtung von Ledderhose†††), dafs das Chitin in konzentrierter Salzsäure ohne Rest gelöst wird und auf Zusatz von überschüssigem Wasser ausfällt, in bestem

*) Jahrbuch f. wissenschaftl. Botanik 1898, S. 619.
**) Wratsch 1901, Nr. 36.
***) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 1899, S. 541.
†) Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 2.
††) Zeitschr. f. physiol. Chemie 21, 134.
†††) Daselbst 2, 213.

Einklange steht. Die qualitativen Reaktionen des tierischen Chitins waren auch an den Pilz- und Bakterienzellmembranen zu erhalten.

Um die chemische Identität mit Chitin zu prüfen, stellte ich nach dem Vorgang von Ledderhose und Winterstein die Zersetzungsprodukte der Zellhäute, wie sie durch Einwirkung von siedender Salzsäure erhalten werden, dar.

Etwa 1 g der lufttrockenen Membranen von Aspergillus wurde in der Porzellanschale mit konzentrierter Salzsäure auf dem Wasserbade zum Sieden erwärmt. Die Lösung bräunte sich rasch, ein Teil der Zellhäute löste sich in der Salzsäure, der andere fiel in braunen Flocken zu Boden. Nach 1 bis $1^1/_4$ Stunden beendigte ich das Erwärmen, die stark sauer reagierende Lösung, von charakteristisch säuerlichsüfsem Geruch wurde abgekühlt, mit dem drei- bis vierfachen Volumen Wasser versetzt, durch Leinwand abfiltriert und nach Winterstein (s. l. a. c.) dialysiert. Das erste nach einer Stunde entnommene stark saure Dialysat, welches nur kleine Mengen von Substanz enthielt, wurde verworfen, die folgenden Dialysate aber wurden gesammelt, am Wasserbade vorsichtig bis zur Sirupkonsistenz abgedampft und in der Kälte krystallisieren gelassen. Anfangs fielen Verunreinigungen aus, dann erschienen durchsichtige, harte Krystalle, diese sammelte ich auf einer porösen Thonplatte und wusch sie sorgfältig mit einer minimalen Wassermenge, dann mit Alkohol und Äther.

Man erhält, auf das Gewicht der verarbeiteten Membranen berechnet, etwa 20 bis 30 Proz. salzsaures Glykosamin bei Aspergillus niger, etwa 40 Proz. bei Boletus edulis und etwa 80 bis 90 Proz. bei Bacillus Megatherium, B. Anthracis und Staphylococcus.

Die Elementaranalysen wurden nur mit den aus Aspergillus und Bac. Megatherium erhaltenen Präparaten ausgeführt, weil einmal das äufsere Ansehen und die Reaktionen bei allen ganz dieselben waren, sodann weil die Krystallmenge bei Bac. Anthracis und Staphylococcus sehr klein war.

Die erhaltenen Krystalle sind durchsichtig, glänzend, hart, schmecken süfs mit einem säuerlich bitteren Beigeschmack, sind leicht löslich in Wasser, schwer in Äther und Alkohol. Die wässerige Lösung reagiert stark sauer, mit Natronlauge erwärmt nimmt sie anfangs gelbliche, dann grünliche, zuletzt schwarzbraune Färbung an, wobei Ammoniak entweicht und sich ein Geruch nach Karamel entwickelt. Die wässerige Lösung gärt nicht mit Hefe und ändert nicht beim Abdampfen ihren Farbenton; die Krystalle bräunen sich nur bei völligem Eintrocknen. Die Verbindung ist aus den Lösungen durch ammoniakalische Bleilösung fällbar; sie reduziert stark Fehling sche Lösung beim Kochen, ja schon nach einiger Zeit in der Kälte, ebenso Silber-, Sublimat- und Wismutoxydlösung (Reag. v. Nylander).

Die Analyse ergab für die Substanz aus Aspergillus niger Stick-

[illegible] Proz., Chlor [illegible] Proz., für jene aus Bacillus Megatherium Chlor [illegible] Proz. Für salzsaures Glykosamin berechnet sich: [illegible] Proz., Chlor [illegible] Proz.

Das gewonnene Zersetzungsprodukt ist daher salzsaures Glykosamin (Chitosamin).

4. Schlufsfolgerungen.

1. Die oben beschriebene Methode von N. P. Krawkow ist vortrefflich geeignet, sowohl die Nukleoproteide der Pilze und Bakterien als auch die Zellmembranen rein zu gewinnen.

2. Die Eiweifsstoffe von Pilzen und Bakterien, nach diesem Verfahren isoliert, erwiesen sich nach Reaktionen und elementarer Zusammensetzung als Nukleoproteide, welche bei den untersuchten Bakterienarten, in Übereinstimmung mit Krawkow, etwa 16 bis 16,3 Proz. N, 1,8 bis 2,2 Proz. P und 1,9 bis 2,1 Proz. S enthalten, bei den Pilzen aber 15,1 bis 16,2 Proz. N, 0,7 bis 1 Proz. P und 1,1 bis 2,14 Proz. S.

Vergleicht man die chemischen Eigenschaften der von anderen Autoren erhaltenen Eiweifssubstanzen mit meinem Befunde, so kann man als wahrscheinlich annehmen, dafs die Eiweifsstoffe, welche von G. Galeotti*), T. Nishimura**), E. Bendix***) u. a. beschrieben worden sind, den Nukleoproteiden von Krawkow und mir nahe verwandt sind. Die Gegenwart der echten Nukleoproteide in der Zelle von Bakterien und Pilzen ist damit bewiesen und dieser Schlufs steht in bestem Einklange mit morphologischen Befunden der neueren Zeit, welche darin die Gegenwart von echten Kernen mit Chromatinsubstanz darthun.

3. Die Analysen der Zellmembranen der Pilze ergaben in Bestätigung der Entdeckungen von E. Winterstein und E. Gilson die Gegenwart von Chitin, wobei anscheinend das Chitin mit einer nicht näher bestimmten stickstofffreien Substanz verbunden ist.

4. Bei den untersuchten Bakterienarten halte ich es nach N. P. Krawkows und meinen Analysen für erwiesen, dafs die Substanz der Zellmembranen, dem tierischen Chitin sehr ähnlich, möglicherweise damit identisch ist. Dafür spricht neben den Analysenergebnissen die Gewinnung von salzsaurem Glykosamin

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 25, 48.

**) Archiv f. Hygiene 18, 318.

***) Deutsche med. Wochenschrift 1901, Nr. 2.

(Chitosamin) in einem Quantum (80 bis 90 Proz.), wie man es aus echtem Chitin unter ähnlichen Bedingungen erhält.

Der scheinbare Widerspruch zwischen meinen Ergebnissen und jenen P. van Wisselinghs läfst sich dadurch erklären, dafs man die zu erhaltende schwache Jodfärbung unter dem Mikroskop bei der minimalen Objektgröfse und der künstlichen Beleuchtung, die für starke Vergröfserungen unumgänglich nötig ist, nur schwer beobachten kann.

Zum Schlusse spreche ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. N. Krawkow, für die wissenschaftliche Leitung meiner Arbeit, seinem Assistenten Herrn Dr. N. Botscharow für seine liebenswürdige Unterstützung meinen herzlichsten Dank aus.

St. Petersburg.

XXXII.

Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweifsbildung der Pflanzen.

Von **F. Czapek.**

(Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Litteratur in Böhmen.)

1. Die Bedeutung der Aminosäuren als Stickstoffquelle bei Schimmelpilzen.

Nach den bisher vorliegenden biochemischen Erfahrungen lassen sich im Pflanzenreiche bezüglich der Stickstoffernährung vier Organismengruppen scheiden: 1. solche, welche freien, elementaren Stickstoff zu binden vermögen; 2. diejenigen, welche mit anorganischen Ammoniaksalzen und anorganischen Nitraten ihr vollständiges Auslangen finden (Nitrat- und Ammmoniakorganismen); 3. solche, die mit organischen Stickstoffverbindungen (exklusive Eiweifsstoffe) am besten gedeihen; 4. endlich Organismen, welche zu ihrer Versorgung mit Stickstoff die Darreichung von Peptonen, Albumosen oder fertigen Eiweifssubstanzen benötigen. Man kann die letzten beiden Gruppen als Amid- respektive Peptonorganismen bezeichnen*).

Zu den Organismen der ersten Gruppe sind bisher nur wenige selbständig oder in Phanerogamenwurzeln symbiotisch lebende Bakterienformen zu rechnen. Der zweiten Gruppe entspricht die grofse Masse der höheren chlorophyllführenden Pflanzen, von den höherstehenden Algen aufwärts. Zur dritten Gruppe darf man rechnen die Mehrheit der Bakterien, Pilze und manche Cyanophyceen, ferner die meisten parasitischen Phanerogamen. In die letzte Gruppe zählen mit Sicherheit unter den Pflanzen nur manche

*) Hierzu: Beyerinck, Botan. Zeitg. 1890. S. 731 Anmerk., u. W. Pfeffer, Pflanzenphysiol., II. Aufl., Bd. I, S. 395 (1897).

saprophytische und parasitische Bakterienformen; vielleicht werden auch einzelne Pilze hierher gehören. An diese pflanzlichen Peptonorganismen schliefsen sich die niedrigen Organismen mit tierischer Ernährungsweise an, bei welchen jedoch leider die Stickstoffversorgung noch viel zu wenig untersucht ist.

Wenn auch die Zahl der einschlägigen Beobachtungen noch gering ist, so dürfen wir schon auf Grund der heute vorliegenden chemischen und physiologischen Erfahrungen mit Recht vermuten, dafs weder die „Amidorganismen" noch die „Peptonorganismen" eine biochemisch einheitliche Gruppe bilden, sondern dafs sich Untergruppen werden unterscheiden lassen, indem nicht alle organischen Stickstoffverbindungen und nicht alle Peptone und Albumosen für die verschiedenen Organismen sich als physiologisch gleichwertig erweisen dürften.

In wesentlich bestimmtere Bahnen werden alle diese Überlegungen und Untersuchungen durch den Umstand gelenkt, dafs es sich sowohl bei Amid- als bei Peptonorganismen um Saprophyten oder Parasiten handelt, welche unter natürlichen Verhältnissen ihren Stickstoff meistens so gut wie ausschliefslich aus unterschiedlichen Eiweifsspaltungsprodukten beziehen. Teils sind es die Endprodukte der Eiweifszersetzung, teils noch komplexe Spaltungsprodukte, welche zur Resorption kommen und vor den anderen bevorzugt werden.

Wir wissen ferner, dafs eine unter natürlichen Verhältnissen durch Bakterien oder Pilze sich vollziehende Eiweifszersetzung nichts anderes ist als eine Hydrolyse der Eiweifssubstanzen durch tryptische Enzyme dieser Organismen, wobei freilich noch durch den Stoffwechsel der Saprophyten sekundäre Produkte hinzukommen, welche bei aseptischer Eiweifshydrolyse fehlen. Amid- wie Peptonorganismen sind daher als Lebewesen aufzufassen, welche der Stickstoffversorgung durch Eiweifsspaltungsprodukte angepafst sind und die graduelle Differenzen in ernährungsphysiologischer Hinsicht aufweisen, indem die einen die Endprodukte, die anderen die Anfangsprodukte der Eiweifshydrolyse bei ihrer Stickstoffernährung vorzugsweise verwenden.

Das Gesagte weist uns darauf hin, welche Wichtigkeit eine eingehende Berücksichtigung der Eiweifsspaltungsprodukte bei der Betrachtung der Ernährung von Amid- und Peptonorganismen besitzt.

Nach unseren heutigen Kenntnissen vom Baue des Eiweifsmoleküls darf man annehmen, dafs dasselbe zunächst aus einigen

Hauptkomplexen, den Albumosen, besteht, welche differente Eigenschaften besitzen und die sich in einfachere, noch wenig bekannte Substanzen spalten lassen, welche wir, soweit sie Biuretreaktion geben, heute als Peptone zusammenfassen. Als Endprodukte ihrer Spaltung erhält man eine Reihe von Aminosäuren, ferner Ammoniak, Cystin (eventuell dessen Abkömmlinge), Kohlehydratgruppen u. s. w., die aus dem Studium der Eiweifshydrolyse bekannt sind.

Es ist anzunehmen, dafs jene Organismen, welche nur durch Pepton oder Albumosen mit Stickstoff versorgt werden können, unfähig sind, die Kondensation der Peptonspaltungsstoffe zu Pepton vorzunehmen. Die Kondensation der Peptone zu Albumosen und weiter die Kondensation der Albumosen zu Eiweifs dürfte wohl allen pflanzlichen Peptonorganismen möglich sein. Im Tierreiche dürften wir aber wohl noch weiteren Spezialisierungen begegnen, es mag Organismen geben, welche wohl aus beliebigen Albumosen das vollständige Eiweifsmolekül aufbauen können, die jedoch nicht im stande sind, die Synthese von Albumosen aus Peptonen zu vollziehen. Dafs im Säugetierkörper eine weitere Einschränkung der Eiweifssynthesenbefähigung gegeben ist, indem nicht einmal mehr aus allen Albumosen Eiweifs restituiert werden kann, haben thatsächlich bereits Erfahrungen der letzten Zeit aus dem Institute F. Hofmeisters gezeigt. Bei den höchststehenden Tieren ist also allem Ermessen nach die synthetische Befähigung auf die Erzeugung von komplexen Proteinen (Nukleoproteiden und anderen) aus den genuinen Eiweifssubstanzen beschränkt.

Gehört dieser Bezirk biochemischer Forschung in erster Linie dem Zoochemiker an, so ist die nicht weniger interessante Frage der Peptonsynthese und weiter der Synthese der Aminosäuren und anderer Endprodukte der Eiweifshydrolyse der Bearbeitung auf phytochemischem Gebiete vorbehalten und sie soll auch in den vorliegenden Untersuchungen der experimentellen Behandlung zugeführt werden.

Die pflanzlichen Amidorganismen besitzen, wie ausgedehnte Erfahrungen gelehrt haben, nicht nur allein (im Gegensatze zu den Peptonorganismen) die Fähigkeit, aus dem Spaltungsgemisch der Peptone diese letzteren Substanzen wieder aufzubauen und weiter (sowie die Peptonorganismen) die Peptone zu Albumosen und schliefslich zu Eiweifs zu kondensieren, sie sind vielmehr, wie hier ausführlich gezeigt werden soll und auch schon durch ältere Beobachtungen dargethan wird, im stande, aus jeder einzelnen be-

liebigen Aminosäure mit grofser Leichtigkeit die ganze Eiweifssynthese zu vollziehen. Dies ist ganz dasselbe Verhältnis, wie bei vielen Peptonorganismen die Art der dargereichten Albumose für die Eiweifssynthese irrelevant ist und jede beliebige Albumose erfolgreich verarbeitet wird.

Es leuchtet aus dem Gange dieser Darlegungen ein, dafs wir auch pflanzliche Organismen erwarten dürfen, für die, im Gegensatze zu anderen, die Aminosäuren als bestes Substrat zur Eiweifssynthese dienen und zwar besser als alle anderen organischen oder anorganischen Stickstoffverbindungen. In der That konnte ich ein solches Verhältnis für einige Schimmelpilze sicherstellen, und es ist zu erwarten, dafs diese biochemische Eigentümlichkeit bei einer grofsen Anzahl von Pilzen, Bakterien und Parasiten höherer Gruppen sich noch fernerhin auffinden lassen wird. Diese „Aminosäurenorganismen" sind jene Untergruppe der Amidorganismen, die sich den Peptonorganismen am nächsten anreihen läfst und im Vergleich zu den letzteren die nächst weitergehende Befähigung zur Eiweifssynthese aufweist.

Wenn bisher diese bemerkenswerte Thatsache ziemlich unbeachtet geblieben ist, so dürfte hieran wohl die Schuld an dem Umstande gelegen haben, dafs die Schimmelpilze bei ihrer Stickstoffernährung und Eiweifssynthese nicht allein auf Aminosäuren oder kompliziertere Stickstoffverbindungen angewiesen sind, sondern auch aus vielen anderen organischen und unorganischen Stickstoffverbindungen Eiweifs synthetisch aufbauen, somit auch Aminosäuren bilden. Die vielen wichtigen Erörterungen, welche sich an die Synthese von Aminosäuren knüpfen, werden in späteren Arbeiten dieser Untersuchungsreihe ihren Platz finden. In der vorliegenden Studie beabsichtige ich nur zu zeigen, dafs (aufser Pepton und Albumosen) thatsächlich die Aminosäuren in ganz hervorragender und auffälliger Art zur Eiweifssynthese der Schimmelpilze verwendet werden, und dafs es augenscheinlich den Pilz mehr Mühe kostet Aminosäuren synthetisch zu erzeugen, als aus einer einzelnen beliebigen Aminosäure seine Eiweifsstoffe aufzubauen. Auch habe ich, um die Fragestellung nicht zu komplizieren, vorläufig aromatische Derivate aufser Bereich der Untersuchung gelassen.

Bemerkungen zur Untersuchungsmethode.

Als Hauptversuchsobjekt wählte ich den allerorts bewährten Aspergillus niger, welcher sich durch die Massenhaftigkeit seiner

Entwickelung, die augenfälligen Vegetationserscheinungen und durch seinen Charakter als distinkte Spezies empfiehlt. Penicillium glaucum wächst etwas weniger ausgiebig, und stellt zum grofsen Teil in der Litteratur nur einen Sammelbegriff für äufserlich ähnlich aussehende Pilzrasen dar.

Aspergillus niger wächst so rasch, dafs er auf sehr günstig zusammengesetztem Substrate in drei Wochen eine Ernte an Trockensubstanz von 500 bis 600 mg ergiebt, wenn man nur 50 ccm Nährlösung anwendet. Im allgemeinen ist das Erntegewicht bei konstanter Zusammensetzung der Nährlösung (wenn diese sehr günstige Wirkung entfaltet) der angewendeten Quantität der Nährlösung proportional:

100	ccm	Nährlösung	ergaben	rund	1	g	Pilzernte
50	„	„	„	„	0,5	„	„
10	„	„	„	„	0,1	„	„

Als Kulturgefäfse dienten mit Baumwollpfropf verschlossene Erlenmeyer-Kölbchen von 250 ccm Inhalt.

Zur Versorgung mit Aschenstoffen wurde eine Stammlösung von Mineralsalzen bereitet von folgender Zusammensetzung:

Destilliertes Wasser	1000	g
Magnesiumsulfat	0,5	„
Kaliumdihydrophosphat . . .	1,0	„
Kaliumchlorid	0,5	„
Ferrosulfat	0,01	„

Diese Lösung wurde entweder zuckerfrei oder zuckerhaltig angewendet, je nachdem aufser der stickstoffenthaltenden Substanz keine weitere Kohlenstoffquelle dargereicht werden sollte, oder eine solche notwendig war. Die zuckerhaltigen Nährlösungen enthielten 3 Proz. Rohrzucker.

In der Regel wurde von der als Stickstoffquelle dienenden Substanz, sobald sie gleichzeitig zur Kohlenstoffversorgung bestimmt war, der Mineralsalzlösung 4 Proz. zugefügt.

Den zuckerhaltigen Lösungen wurde hingegen nur 1 Proz. der stickstoffbietenden Stoffe zugesetzt.

Die fertige Nährlösung mufs schwach sauer oder ganz neutral reagieren, wenn sie das Pilzwachstum durch ihre Reaktion nicht stören soll.

Von gewissen Gesichtspunkten aus wäre es vielleicht angezeigt erschienen, die Konzentration der stickstoffhaltigen Substanzen in den zu vergleichenden Versuchen so zu wählen, dafs alle Lösungen

gleich viel N enthalten hätten und keine derselben absolut N-reicher oder N-ärmer gewesen wäre*). In den meisten meiner Versuche kamen jedoch Stoffe zum Vergleiche, deren N-Gehalt sich nur wenig unterscheidet.

So enthält

1 Teil Glykokoll so viel N wie 1,027 Teile Ammonacetat,
1 „ Alanin „ „ „ „ 1,026 „ Ammonpropionat,
1 „ Asparagin „ „ „ „ 1,153 „ Ammonsuccinat,

und so fort.

Meist sind die Differenzen im Stickstoffgehalt nur klein, oft so klein, dafs man sie auf jeden Fall vernachlässigen kann.

Da sehr viele zur Untersuchung gelangende Substanzen selbst bei kurzdauerndem Erhitzen auf 100 Grad Ammoniak verlieren, so verzichtete ich gänzlich auf das Sterilisieren der Lösungen durch höhere Temperatur. Das Keimfreimachen der Nährsubstrate gelang rasch und mit sicherem Erfolge ohne Alteration der Zusammensetzung der Lösungen mittels Filtration durch Ballon-Thonfilter nach Pukall (bezogen von der Firma Lautenschläger in Berlin). Wie genaue Kontrolle ihrer Wirksamkeit lehrte, blieben diese Thonfilter wenigstens drei Monate während stetigen Gebrauches sicher bakteriendicht. Mit der Zeit werden sie aber verstopft oder sie erleiden durch das tägliche Sterilisieren kleine Sprünge, wodurch sie unbrauchbar werden. Für die Filtration eiweifshaltiger und encymhaltiger Flüssigkeiten möchte ich diese Filter nicht so sehr empfehlen, weil sie manche Proteinsubstanzen zurückhalten.

Aus dem Absaugekölbchen füllte ich die keimfreie vollkommen klare Lösung mittels sterilisierter 50 ccm-Pipette in die vorher durch einstündiges Erhitzen auf 150 Grad sterilisierten Erlenmeyerkölbchen ab. Die Kölbchen blieben hierauf zur Kontrolle der sterilen Beschaffenheit ihres Inhaltes fünf bis sieben Tage im Thermostaten bei 28° C. im Dunkeln stehen und wurden sodann bei steriler Beschaffenheit mit Konidien von Aspergillus niger geimpft.

Um die gleiche Quantität Impfmaterial in jedem einzelnen Versuche zur Anwendung zu bringen, stellte ich mir eine sehr verdünnte Aufschwemmung von Aspergillus-Konidien in sterilisiertem destillierten Wasser her, deren Konidiengehalt durch mikroskopische Zählung bestimmt wurde. Hiervon wurde sodann jedem Kölbchen 0,1 ccm zugefügt. Durch entsprechende Ver-

*) Hierzu L. Lutz, Annal. d. scienc. natur. Botan. (8) 7, p. 1 (1899).

dünnung oder Vermehrung der Konidienmenge in der Aufschwemmung suchte ich das Impfmaterial auch in den verschiedenen Versuchsreihen während der ganzen Arbeitszeit quantitativ gleich zu erhalten. Natürlich ist man so nur annähernd im stande, eine bestimmte Konidienmenge zur Impfung zu verwenden. Um zu sehen, ob die Verwendung einer verschieden grofsen Menge von Impfmaterial auf die Versuchsergebnisse einen nennenswerten Effekt ausüben, wurden besondere Untersuchungen angestellt. Dabei ergab sich aber, dafs der Zusatz sehr grofser und sehr kleiner Konidienquantitäten auf das Wachstum der Kultur und auf das Erntegewicht keinen merklichen Einfluſs ausübt. Es konnten deshalb aus meinem Vorgehen bei der Impfung nicht gut erhebliche Versuchsfehler erwachsen.

Die geimpften Kulturen standen unberührt meist 21 bis 22 Tage im dunkeln Raume des Thermostaten bei konstant 28° C., worauf sie in allen Fällen das Maximum ihrer Entwickelung erreicht hatten.

Die ersten Räschenspuren treten bei verschiedenen Nährlösungen zu ungleichen Zeiten auf. Auf sehr günstigem Substrate sieht man sie schon nach zwei bis drei Tagen, auf minder günstigen Nährlösungen infolge Verzögerung der Keimung oft erst nach acht Tagen. In 14 Tagen pflegt der Rasen nahezu seine volle Entwickelung erreicht zu haben und nimmt in der darauffolgenden Woche nur noch wenig an Gewicht zu. Das Aussehen der Rasen ist je nach der Nährlösung sehr verschieden. Auf einigermafsen günstigem Substrate bildet der Pilz eine fest zusammenhängende, weifse, etwas netzig gefaltete Myceldecke mit dichtem schwarzen Konidienüberzug. Ist das Substrat etwas weniger gut, so wird die Myceldecke weniger dicht, mehr schleimig, während die Konidienmenge noch recht grofs ist. Manchmal wie auf Betainlösung, Glykosaminchlorhydrat, ist eine massige weifse Mycelschicht ausgebildet, hingegen nur wenige Konidien. Auch Bildung gelben Farbstoffes läfst sich in einzelnen Fällen beobachten. Seltener haben die Konidien eine hellere Farbe, so dafs die Konidienschicht statt schwarz schokoladebraun erscheint.

Von jedem Versuche wurden meist drei Kölbchen aufgestellt, um die Variation des Erntegewichtes unter möglichst ähnlichen Versuchsbedingungen und die hieraus resultierenden Versuchsfehler kennen zu lernen. Oft betrugen die Gewichtsdifferenzen nur wenige Milligramm, auch wenn es sich um Ernteergebnisse von 0,5 g handelte. Immer aber bewegten sich die Schwankungen weit

unter der sonst bei physiologischen Erfahrungen zu beobachtenden Fehlergrenze von + 10 Proz., wie aus den im Anhange beigefügten experimentellen Belegen zu ersehen ist.

Nach Beendigung der Vegetation wurden die Pilzrasen von der Flüssigkeit mittels Filtrieren durch getrocknete, gewogene, aschefreie Filter getrennt, im Kölbchen noch dreimal mit je 50 ccm kalten destillierten Wassers gewaschen, die Waschwässer abfiltriert schliefslich wurde die Pilzdecke auf das Filter gebracht und dort nochmals nachgewaschen. So blieb in dem Filterinhalte keine Spur der Nährlösung zurück. Filter und Pilzernte wurden dann bis zur Gewichtskonstanz bei 100 Grad getrocknet und gewogen.

Das Gewicht der Trockensubstanz der Pilzernte giebt uns zunächst einen Mafsstab für den Erfolg des Vegetationsprozesses unter den obwaltenden Versuchsbedingungen, von welchen hier nur die Art der Stickstoffquelle variiert wurde. Wir können aus dem Erntegewicht aber auch erfahren, ob die Proteinsynthese bei einer bestimmten Ernährungsart leicht oder schwierig vor sich geht, und können weiter auch in jenen Fällen, in welchen keine fertigen Aminosäuren dargereicht wurden, Rückschlüsse ziehen auf die Möglichkeit und den Fortgang der Synthese von Aminosäuren.

Ist der Pilzrasen gut entwickelt und von normalem Aussehen, so beträgt, wie ich mich durch zahlreiche Bestimmungen überzeugen konnte, sein Gehalt an Gesamtstickstoff mit geringen Schwankungen regelmäfsig zwischen 10 und 11 Proz. der Trockensubstanz, und auch die Menge an Proteinstickstoff bleibt annähernd dieselbe. Wir dürfen somit die Trockensubstanzzahl als Mafs der Proteinerzeugung ansehen. Abweichungen von dieser Erfahrung ergeben sich in jenen Fällen, in denen die Konidienschichte nur mäfsig, die Mycelschichte auffallend stark ist, und auch in jenen Kulturen, woselbst nur eine dünne schleimige Mycelschichte und viele Konidien ausgebildet sind. In den ersteren Fällen ist die Zahl des Gesamtstickstoffes und des Protein-N herabgesetzt (auf 9, auch 8 Proz.), in letzteren Fällen etwas höher als in Normalkulturen. Die Relation zwischen Gesamt-N und Protein-N ändert sich aber in allen Fällen nur wenig. In normal wachsenden Kulturen ist also die Art der Stickstoffquelle für das Verhältnis Trockensubstanz : Gesamt-N und für das Verhältnis Gesamt-N : Protein-N irrelevant. Wir können demnach feststellen, dafs die Trockengewichtszahl auch über die Intensität, den quantitativen Fortgang der Proteinsynthese Aufschlufs giebt.

Durch die Arbeiten des Strafsburger physiologisch-chemischen Institutes wurde der Erkenntnis Bahn gebrochen, dafs der Eiweifsstickstoff in drei Hauptgruppen geschieden werden kann: leicht abspaltbarer Amid-N, durch Phosphorwolframsäure fällbarer Diamino-N und schwerabspaltbarer N der Monaminosäuren. Ich legte mir nun auch die Frage vor, ob nicht durch die Art der Stickstoffernährung sich in dem Schimmelpilzeiweifs der Gehalt an diesen drei Stickstoffformen ändert. Die ausführliche Besprechung dieser Untersuchungen behalte ich mir noch vor. Doch will ich hier das nicht unwichtige Ergebnis hervorheben, dafs eine Alteration des Verhältnisses dieser drei Bindungsformen des Stickstoffes bei verschiedenartiger Stickstoffernährung nicht beobachtet werden konnte. Bei einer bestimmten Quantität an Pilzernte wird also nicht nur eine hierdurch bestimmte Menge an Gesamt-N und Protein-N, sondern auch eine durch die Trockenerntezahl bestimmte Menge an Amid-N, Monamino- und Diamino-N gefunden.

Es ist also aussichtslos, auf diesem Wege etwas über den Vorgang der Eiweifssynthese zu erfahren. Durch eine entsprechende Stickstoffnahrung wird der Gang des Stoffwechselgetriebes stets in die gleiche Bewegung gesetzt, wie auch immer die chemische Natur der dargereichten Substanzen beschaffen ist. So erfahren wir über die Natur der Eiweifssynthese ebenso wenig, wie wir etwas über die Natur des Werkes einer Uhr erfahren, wenn wir deren Pendel durch verschiedene Mittel in Bewegung setzen. Andererseits besitzen wir aber, wie bereits oben hervorgehoben, in der Trockenerntezahl nicht nur ein Mafs des Vegetationsprozesses, sondern auch einen quantitativen Anhaltspunkt sowohl für die Proteinsynthese als für die Synthese der wichtigsten Bausteine des Eiweifsmoleküls, der Aminosäuren. Fassen wir die höher zusammengesetzten Proteide ins Auge, so gilt natürlich dasselbe für die Nukleoproteide, Nukleinsäuren u. s. w.

Man kann also sehr wohl die Trockensubstanz der Pilzernte als Mafs der Eignung der Aminosäuren und anderer Stickstoffverbindungen als Rohmaterial für die Proteinsynthese ansehen. Man kann weiter die einzelnen verschiedenen Aminosäuren durch genau vergleichbare Versuche sehr gut hinsichtlich ihrer Eignung zur Eiweifssynthese studieren.

Die Resultate solcher Bemühungen sind nun im Nachfolgenden niedergelegt.

Die Versuchsresultate.

Um zu entscheiden, inwiefern den Aminosäuren ein besonderer Wert bei der Proteinsynthese der Schimmelpilze zukommt, empfiehlt es sich zunächst, dieselben in genau vergleichbaren Versuchen parallel mit ihren nächsten Verwandten anzuwenden. Ich studierte daher vergleichend die zu den einzelnen Fettsäuren zugehörigen stickstoffhaltigen Derivate, nämlich:

Ammoniumsalz,
Säurecamid,
Säurenitril,
Aminosäure und Amid derselben,
Ammoniumsalz der zugehörigen Oxysäure und
Diaminosäure.

In dieser Art kann man die Derivate der Fettsäurereihe untersuchen, soweit die Substanzen mit steigendem Kohlenstoffgehalt noch hinreichend in Wasser löslich, also als Nährstoffe anwendbar sind. Auch die Derivate der Oxalsäurereihe, unter welche wichtige Spaltungsprodukte der Eiweifssubstanzen zählen, wurden in der gleichen Weise studiert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen finden sich beistehend tabellarisch zusammengestellt, und man kann aus der Tabelle sofort ersehen, wie bedeutend der relative Nährwert der Aminosäuren im Vergleiche zu den anderen Stickstoffverbindungen ist.

Die meisten der angewendeten Präparate waren von Merck-Darmstadt bezogen. Butyramid, Butyronitril und Isovaleronitril von Schuchardt-Görlitz. Die Aminobuttersäure stellte ich mir aus Monobrombuttersäure und Ammoniak nach der Vorschrift von E. Fischer*) selbst dar; die Aminovaleriansäure war aus einem selbstbereiteten Argininpräparat (aus Fichtensamenprotein nach E. Schulze**) hergestellt worden.

Die angeführten Zahlen zeigen, dafs die Derivate der Essigsäurereihe ihren vollen Nährwert erst entfalten, wenn gleichzeitig eine gute Kohlenstoffquelle (hier 3 Proz. Rohrzucker) dargereicht wird. Nur die Aminopropionsäure war in meinen Versuchen auch ohne Zuckerzusatz eine relativ gute C- und N-Nahrung. Sonst nützt der Pilz ohne Zuckerzusatz den dargereichten Stickstoff gar nicht aus. Dies tritt auch bei den Bernsteinsäurederivaten deutlich her-

*) E. Fischer, Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. 33, II, 2387 (1900).
**) E. Schulze, Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 276 und 25, 360; ferner N. Rongger, Landw. Versuchsstat. 51, 89 (1899).

Fettsaures Ammoniumsalz		Oxyfettsaures Ammonsalz		Säureamid		Säurenitril		Aminosäure	
Ameisensaures Ammon		(Kohlensaures Ammon)		(Karbaminsäure) (als Äthylurethan)		Cyanwasserstoff		(Harnstoff)	
ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker
—	—	—	—	—	189,4 mg	—	—	—	180,3 mg
—	—	—	—	—	149,6 „	—	—	—	200,8 „
—	—	—	—	—	199,2 „	—	—	—	198,3 „
—	—	—	—	—	—	—	—	—	258,5 „
Essigsaures Ammon		Glykolsaures Ammon		Acetamid		Acetonitril		Aminoessigsäure	
ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker
—	—	7,3 mg	395,6 mg	56,2 mg	513,8 mg	34,2 mg	9,7 mg	29,4 mg	561,1 mg
—	—	9,6 „	340,0 „	42,3 „	530,1 „	30,5 „	8,2 „	30,0 „	537,0 „
—	—	21,5 „	412,3 „	47,2 „	529,3 „	30,0 „	9,9 „	27,4 „	514,2 „
Propionsaures Ammon		Milchsaures Ammon		Propionamid		Propionitril		Aminopropionsäure	
ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker
—	—	16,9 mg	542,7 mg	—	308,9 mg	—	—	212,7 mg	624,4 mg
—	—	19,3 „	541,8 „	—	190,2 „	—	—	196,4 „	642,2 „
—	—	17,8 „	596,4 „	—	124,2 „	—	—	185,7 „	645,4 „
Buttersaures Ammon		β-oxybuttersaures Ammon		Butyramid		Butyronitril		Aminobuttersäure	
ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker
—	—	73,8 mg	501,1 mg	—	—	—	—	—	494,9 mg
—	—	112,4 „	487,9 „	—	—	—	—	—	—
—	—	93,1 „	508,0 „	—	—	—	—	—	—

Fettsaures Ammoniumsalz		Oxyfettsaures Ammoniumsalz		Säureamid		Säurenitril		Aminosäure	
Valeriansaures Ammon		Oxyvaleriansaures Ammon*)		Isovaleramid		Isovaleronitril		Aminovaleriansäure	
ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker
—	—			—	7,2 mg	—	—	—	511,3 mg
—	—			—	4,4 „	—	—	—	503,6 „
—	—			—	1,2 „	—	—	—	499,8 „
n-kapronsaures und isobutylessigs. Ammon		Oxykapronsaures Ammon*)		Kapronamid		Kapronitril		Aminokapronsäure (Leucin)	
ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker
—	—			—	—	—	—	—	332,4 mg
—	—			—	—	—	—	—	430,0 „
—	—			—	—	—	—	—	416,6 „
—	—			—	—	—	—	—	449,3 „
Bernsteinsaures Ammon		Monoxybernsteinsaures (äpfelsaures) Ammon		Dioxybernsteinsaures (weinsaures) Ammon		Bernsteinsäurenitril		Asparagin	
ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker	ohne Zucker	mit Zucker
54,9 mg	576,8 mg	138,8 mg	625,7 mg	78,9 mg	585,5 mg	—	—	21,6 mg	579,2 mg
53,0 „	483,1 „	207,0 „	627,1 „	89,5 „	578,9 „	—	—	18,6 „	601,3 „
—	488,5 „	200,6 „	625,3 „	93,6 „	568,7 „	—	—	22,2 „	595,5 „

*) War mir unzugänglich.

vor, wo mit der vierfachen Menge Asparagin-N ohne gleichzeitigen Zuckerzusatz nur ungefähr ein Dreifsigstel jener N-Ernte erzielt wird, welche mit der einfachen Menge Asparagin-N + 3 Prozent Saccharose erreicht wird. Es kommen daher für den Vergleich nur die Zahlen der zweiten Kolonne („mit Zuckerzusatz") bei jedem Versuche in Betracht.

Es ist allenthalben zu sehen, dafs die Erntezahlen bei Darreichung von Aminosäuren die gröfsten sind. In der Regel folgt als zweitgröfste Erntezahl jene bei Darreichung des oxyfettsauren Ammonsalzes. Nur in der Gruppe der Essigsäure übertrifft der Nährwert des Acetamides die Wirkung des Ammonglykolates. Die Erntezahlen bei Darreichung der Säureamide fallen bereits viel schwächer aus. Hier ist nur das Acetamid ein sehr guter Nährstoff, weniger Propionamid, noch weniger Äthylurethan. Isovaleramid und Kapronamid sind fast wirkungslos. Die Säurenitrile sind durchweg schlechte Nährstoffe, was die Erfahrungen von L. Lutz*) bestätigt. Am besten wirkt noch Acetonitril, und dieses auffallenderweise etwas besser ohne Zuckerzusatz als bei gleichzeitiger Anwesenheit von 3 Proz. Saccharose. Die schlechtesten Stickstoffquellen waren, wie die Tabelle zeigt, in meinen Versuchen die Ammonsalze der Monokarbonsäuren, auf welchen unter den gesetzten Bedingungen weder mit noch ohne Zuckerzusatz ein Wachstum zu beobachten war. Die Ammonsalze der zweibasischen Säuren hingegen sind durchweg gute Stickstoffquellen bei gleichzeitiger Zuckerdarreichung. Die Tabelle zeigt auch, dafs die Nährwertskala bei der Bernsteinsäure anders ausfällt als bei den Gliedern der Essigsäurereihe:

Essigsäurereihe:	Oxalsäurereihe:
1. Fettsaures Ammon	1. Säurenitril
2. Säurenitril	2. Säureamid
3. Säureamid	3. Ammonsalz
4. Oxyfettsaures Ammon	4. Oxysäure-Ammonsalz
5. Aminosäure	5. Aminosäure

Die Eiweifssynthese wird demnach aus Aminosäuren (und Diaminosäuren) am leichtesten und ausgiebigsten bewerkstelligt, wenn man gleichzeitig eine gute Kohlenstoffquelle, z. B. eine Zuckerart, darreicht. Es vermag also der Schimmelpilz aus irgend einer beliebigen Aminosäure viel leichter alle übrigen, welche als Bausteine

*) L. Lutz, Extrait des Compt. rend. du Congrès des Soc. sav. en 1900. Sciences (1901).

des Eiweifsmoleküls in Betracht kommen, zu bilden, als erst aus anderen Stickstoffverbindungen Aminosäuren synthetisch aufzubauen. Man kann ferner annehmen, da die Aminosäuresynthese als Vorstufe zur Eiweifsbildung anzusehen ist, dafs aus jenen Stoffen, welche am besten als N-Quellen dienen (hier besonders den Oxyfettsäuren), auch am leichtesten die Synthese der Aminosäuren bewerkstelligt werden kann — ein Gedanke, welcher in ferneren Untersuchungsreihen noch weiter verfolgt werden soll.

Ein Vergleich der Nährwirkung der einzelnen untersuchten Aminosäuren ergiebt nur geringe Differenzen, da die erhaltenen Erntegewichte sämtlich dem unter den gesetzten Versuchsbedingungen überhaupt möglichen Maximum der Pilzentwickelung sehr nahekommen. Am schwächsten wirkten die Aminoderivate der Ameisensäure, die Karbaminsäure und der Harnstoff, welche beide ungefähr halb so gute Nährstoffe darstellen wie die Aminosäuren mit höherem Kohlenstoffgehalt.

Hervorzuheben ist der für ein Säureamid auffallend hohe Nährwert des Acetamides, welches an Wirkung den Aminosäuren fast gleichkommt. Chemisch-physiologisch wird dies, wie ich glaube, verständlich, indem das Acetamid als sehr einfach gebautes Molekül noch immer viel Analogieen mit der Harnstoffgruppe zeigt:

Aceton	Essigsäure	Acetamid	Harnstoff	Karbamins.	Kohlens.
$CO<^{CH_3}_{CH_3}$	$CO<^{CH_3}_{OH}$	$CO<^{CH_3}_{NH_2}$	$CO<^{NH_2}_{NH_2}$	$CO<^{OH}_{NH_2}$	$CO<^{OH}_{OH}$

Harnstoff und Karbaminsäure können sowohl als Aminosäure wie als Säureamid betrachtet werden, weil die Kohlensäure oder Oxyameisensäure eine Mittelstellung zwischen den Oxyfettsäuren und Dikarbonsäuren einnimmt. Doch ist der Aminosäurecharakter in ihrer physiologischen Wirkung schon deutlich ausgesprochen, und diesen schwächsten und einfachsten Aminosäuren steht auch das Acetamid noch nicht fern.

Den Einfluſs von verschiedenen Substitutionen auf die Nährwirkung von Aminosäuren habe ich bei einer Anzahl von Derivaten des Glykokolls und Alanins und Harnstoffs untersucht. Unter allen diesen Substanzen sind nur wenige, deren Nährwert jenem der reinen Aminosäuren gleichkommt.

1. Derivate des Harnstoffs. Die Kuppelung zweier Harnstoffmoleküle im Biuret

$$\begin{array}{ccc} CO & — NH — & CO \\ | & & | \\ NH_2 & & NH_2 \end{array}$$

hat auf die Eignung als Nährstoff, wie theoretisch zu erwarten ist, keinen grofsen Einflufs. Ohne Zuckerzusatz wächst Aspergillus auf Biuret ebenso wenig wie auf Harnstofflösung. Mit 3 Proz. Rohrzuckerzusatz erhielt ich als Erntegewichte 172,4, 143,7 und 211,2 mg.

Durch Überführen des Harnstoffs in sein Amidin, das Guanidin,

$$NH.C<\begin{matrix} NH_2 \\ NH_2 \end{matrix}$$

steigert man den Nährwert jedoch beträchtlich. Auf salzsaurem Guanidin erreichte Aspergillus folgende Erntegewichte:

4 Proz. Guanidin ohne Zucker	1 Proz. Guanidin, 3 Proz. Rohrzucker
39,2 mg	429,1 mg
37,7 „	514,8 „
39,2 „	565,3 „

also gegen Harnstoff eine Steigerung um mindestens das Doppelte.

Die Methylguanidin-Essigsäure oder das Kreatin

$$NH.C<\begin{matrix} NH_2 \\ N.CH_3.CH_2.COOH \end{matrix}$$

wirkt bedeutend schlechter als das Guanidin. Ich erhielt auf 1 Proz. Kreatin + 3 Proz. Rohrzucker eine Pilzernte von 26,6 mg.

Thioharnstoff:

$$CS<\begin{matrix} NH_2 \\ NH_2 \end{matrix} \quad \text{oder} \quad NH.C<\begin{matrix} NH_2 \\ SH \end{matrix}$$

ist zur Ernährung von Aspergillus niger mit Stickstoff durchaus unbrauchbar.

2. Derivate des Glykokolls. Ich studierte zwei Derivate der Aminoessigsäure, welche eine treffliche Stickstoffquelle ist. Die Methylaminoessigsäure oder Sarkosin

$$\begin{array}{l} CH_2.NH.CH_3 \\ \cdot \\ COOH \end{array}$$

ist kein schlechter Nährstoff, steht jedoch an Wirksamkeit dem Glykokoll wesentlich nach. Erntegewichtszahlen in 1 Proz. Sarkosin + 3 Proz. Rohrzucker: 145,7; 149,9; 151,0 mg.

Trimethylglykokoll oder Betaïn

$$\begin{array}{l} CH_2 \;.\; N.(CH_3)_3 \\ \cdot \\ CO.O \diagup \end{array}$$

in Form seines salzsauren Salzes in 1 proz. Lösung unter Zusatz von 3 Proz. Rohrzucker angewendet, unterhält das Wachstum von Aspergillus, so dafs sehr hohe Erntegewichte erzielt wurden. In drei Versuchen: 655,4; 660,2; 646,2 mg. Doch ist die stark entwickelte Pilzdecke konidienarm und erzeugt einen abnormen schwefelgelben Farbstoff.

3. Derivate des Alanin. Hier wurde Tyrosin untersucht, das ebenso gut wirkt wie Alanin selbst. Die Erntegewichte fallen wohl nur der Schwerlöslichkeit der Substanz wegen geringer aus als bei der einfachen Aminopropionsäure.

Durch die angeführten Thatsachen ist die hervorragende Eignung der Aminosäuren als Stickstoffnahrung, zunächst für Aspergillus niger, wohl aufser Zweifel gestellt.

Man mufs daher annehmen, dafs einerseits die Meinung berechtigt ist, dafs die Aminosäurensynthese eine Vorstufe zur Eiweifsbildung ist; andererseits dafs der Aspergillus wesentlich in seinem Gedeihen unterstützt wird, wenn man ihm die Arbeit der Aminosäurensynthese erspart und ihm fertige Aminosäuren darreicht.

Die Verarbeitung fertiger Aminosäuren zu Eiweifs vollzieht aber Aspergillus niger mit gröfster Leichtigkeit, ob man ihm nun eine einzige beliebige Aminosäure oder ein Gemenge aus verschiedenen Aminosäuren beliebiger Zusammensetzung als Stickstoffquelle darreicht. Dies ist auch für die Phanerogamen anzunehmen, weil z. B. in etiolierten Keimlingen, sobald man dieselben dem Lichte wieder aussetzt, das während der Verdunklung reichlich angesammelte Asparagin oder Glutamin alsbald zu Eiweifs verarbeitet wird. In beiden Fällen, beim Schimmelpilz und bei der phanerogamen Keimpflanze, fällt jedoch die Eiweifsbildung aus der dargereichten Aminosäure nur sehr spärlich aus, wenn man nicht gleichzeitig für reichliche Zuckerzufuhr (oder Zufuhr einer anderen guten Kohlenstoffquelle) sorgt. Diesen Zucker bereitet sich die wiederbeleuchtete Keimpflanze selbst, während dem Schimmelpilz in unseren Versuchen Zucker dargereicht wurde.

In den Prozefs der Eiweifssynthese im engeren Sinne haben wir damit vorläufig noch keinen weiteren Einblick gewonnen. Es steht aber fest, dafs der gesamte Stickstoff der gebildeten Proteine aus dem Aminosäurestickstoff stammen und dafs dieser hervorragend zur Weiterverarbeitung zu den Formen des Stickstoffes im Protein geeignet sein mufs. In der That ist ja, wie wir heute durch die Untersuchungen über den Eiweifsstickstoff seitens einer Reihe von

Forschern wissen, ein sehr erheblicher Anteil des Eiweifs-N in derselben Bindungsform vorhanden wie in den Aminosäuren, und auch den Diamino-N dürfen wir hierher zählen, weil sein eigentümlicher analytischer Charakter nur durch die gleichzeitige Gegenwart zweier $CH.NH_2$-Gruppen in einer Kohlenstoffkette bedingt ist.

Es ist bekannt, dafs der Stickstoff in den Aminosäuren im Gegensatze zum Stickstoff der Säureamide und Ammonsalze wie Nitrile sehr fest gebunden ist, und nur durch lange Behandlung mit konzentrierten Alkalien oder Säuren als Ammoniak-N abgespalten werden kann, ein Verhältnis, welches man auch durch die Betrachtung von Aminosäuren als cyklische Ammonsalze theoretisch passend ausdrücken kann. Z. B. Glykokoll:

$$\begin{matrix} CH_2 \,.\, NH_3 \\ CO.O \end{matrix}$$

Die feste Bindung des N hat die Synthese der Aminosäuren im Organismus zum Ziele. Wahrscheinlich müssen, wenn irgend eine N-haltige Substanz im Organismus assimiliert wird, d. h. zu Eiweifs verarbeitet werden kann, vorübergehend aus der stickstoffhaltigen Nahrung immer erst Aminosäuren formiert werden, und wir haben in der Erforschung der Aminosäurensynthese ein ebenso wichtiges wie interessantes Forschungsgebiet vor uns, welches in weiteren Arbeiten dieser Reihe behandelt werden soll. Auf Grund der gewonnenen Gesichtspunkte dürfen wir aber schon heute voraussagen, dafs eine N-haltige Substanz, welche auf leichte Art in Aminosäuren überzuführen ist, in den allermeisten Fällen eine gute Stickstoffnahrung abgeben wird, und dafs in allen Fällen, in welchen eine gut nährende Stickstoffverbindung bisher nicht ohne weiteres in Zusammenhang mit den Aminosäuren zu bringen war, ein solcher Zusammenhang aufzusuchen und auch zu finden sein wird.

Experimentelle Belege.

In allen angeführten Versuchen war die Temperatur konstant 28°, die Kulturen standen im Dunkeln. Als „Mineralsalzlösung" wird verstanden eine Lösung von 0,5 g $MgSO_4$, 1,0 g KH_2PO_4, 0,5 g KCl, 0,01 g $FeSO_4$ in 1000 g destill. Wasser.

1. Aspergillus niger im Thermostaten vom 5. bis 25. Februar 1901. Drei Kulturen mit 50 ccm Mineralsalzlösung, 1 Proz. Ammoniumacetat. Kein Wachstum.

2. Aspergillus niger im Thermostaten vom 5. bis 25. Februar 1901. Drei Kulturen: 50 ccm Mineralsalzlösung, darin 1 Proz. Glykokoll.

Am 25. Februar schwache Räschen mit schwacher Konidienbildung. Trockensubstanzgewichte in Milligramm: 40,4; 16,1; 35,1.

3. Aspergillus niger im Brutschrank vom 7. bis 28. Februar 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 3 Proz. Rohrzucker und 1 Proz. Ammonacetat. Nichts gewachsen. Ferner drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 3 Proz. Rohrzucker und 1 Proz. Glykokoll. Schöne Rasen mit reicher Konidienbildung, die ganze Oberfläche bedeckend. Trockenerntegewichte in Milligramm: 561,1; 537,0; 514,2. Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab N in Milligramm: 72,87; 70,00; 70,96; oder in Prozenten der Trockensubstanz: 12,987; 13,035; 13,800; im Mittel 13,27 Proz.

4. Aspergillus niger im Brutschrank vom 26. Februar bis 22. März 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 4 Proz. Ammonacetat und 3 Proz. Rohrzucker. Nichts gewachsen.

5. Aspergillus niger im Brutofen vom 28. Februar bis 22. März 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 4 Proz. Glykokoll. Decken konidienreich. Mycel locker, doch zusammenhängend, schleimig. Erntegewichte in Milligramm: 29,4; 30,0; 27,4.

6. Aspergillus niger im Brutschrank vom 18. März bis 9. April 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 4 Proz. Ammonpropionat. Nichts gewachsen.

Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 1,5 g Rohrzucker und 0,5 g Ammonpropionat. Ebenfalls nichts gewachsen.

7. Aspergillus niger im Brutschrank vom 28. März bis 15. April 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Ammon-n-kapronat. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 1,5 g Rohrzucker und 0,5 g Ammoniumkapronat. Nirgends Wachstum.

8. Aspergillus niger im Brutschrank vom 29. März bis 15. April 1901. Der Versuch gleich dem vorigen, nur an Stelle des Kapronates n-valeriansaures Ammon in der gleichen Menge dargereicht. Ebenfalls kein Wachstum.

9. Aspergillus niger im Brutschrank vom 19. März bis 10. April 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Alanin. Bilden gleichmäfsige schwarzbraune Decken mit gut entwickelter weifser Mycelschicht (I, II, III). Ferner drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Alanin und 1,5 g Saccharose. Aussehen der Kulturen wie bei I bis III, doch etwas mehr polsterförmig, in der Mycelschicht dichter (IV, V, VI).

Trockenerntegewichte in Milligramm:

I. . . .	212,7	IV. . . .	624,4
II. . . .	196,4	V. . . .	642,2
III. . . .	185,7	VI. . . .	645,4

Gesamt-N-bestimmung nach Kjeldahl ergab an N in Prozenten der Trockensubstanz:

I. . . .	13,074	IV. . . .	9,829
II. . . .	14,647	V. . . .	10,302
III. . . .	14,458	VI. . . .	10,326

10. Aspergillus niger im Brutschrank vom 13. April bis 5. Mai

1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Ammoniumlaktat. Schwaches Wachstum, gute Konidienbildung, Mycel locker, schleimig. Kulturflüssigkeit filtriert rasch, ist farblos (I, II, III). Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Ammonlaktat, 1,5 g Saccharose. Prachtvolle Decke mit faltigem, weifsem, festem Mycel und gleichmäfsiger schwarzer Konidienschicht (schon sehr bald nach Versuchsaufstellung, am 20. April, fast maximal ausgebildet). Kulturflüssigkeit gelb, filtriert langsam (IV, V, VI). Trockenerntegewichte in Milligramm:

I. . . .	16,9	IV. . . .	542,7
II. . . .	19,3	V. . . .	541,8
III. . . .	17,8	VI. . . .	596,4

11. Aspergillus niger im Brutschrank vom 28. März bis 21. April 1901. Vier Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Leucin und 1,5 g Rohrzucker. Gute schwarze Decke, doch ohne übermäfsig stark entwickelte weifse Mycelschicht. Trockenerntegewichte waren in Milligramm:

I. . . .	332,4	III. . . .	416,6
II. . . .	430,0	IV. . . .	449,3

Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab an N in Prozenten der Trockensubstanz:

I. und II.	verunglückt
III.	11,739
IV.	11,738

12. Aspergillus niger im Thermostaten vom 11. April bis 2. Mai 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 1,5 g Saccharose und so viel Tyrosin, als darin löslich. Schleimige, weiche Pilzdecke mit vielen Konidien, keine feste Mycelschicht. Trockensubstanzgewichte in Milligramm: 143,2; 144,8; 152,6.

13. Aspergillus niger im Thermostaten vom 18. April bis 14. Mai 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Guanidin als Chlorhydrat und 1,5 g Saccharose. Üppige normale Decke mit gut entwickeltem Mycel. Trockensubstanzgewichte in Milligramm: 429,1; 514,8; 565,3.

14. Aspergillus niger im Brutschrank vom 24. April bis 31. Mai 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 2 g salzsaurem Guanidin. Pilzdecke sehr dünn, locker, doch ziemlich zusammenhängend. Konidien schwarz, dünn gesäet. Ernte in Milligramm: 39,2; 37,7; 39,2.

15. Aspergillus niger im Brutschrank vom 19. April bis 17. Mai 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Biuret und 1,5 g Rohrzucker. Decke ganz gut zusammenhängend entwickelt, weifs, dicht. Konidien nur sehr spärlich. Ernte in Milligramm: 172,4; 143,7; 211,2.

16. Aspergillus niger im Brutschrank vom 24. April bis 28. Mai 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Biuret (ein Teil des gelösten Biurets krystallisierte beim Stehen wieder aus).

Nur vereinzelte weifse Ballen von 3 mm Durchmesser entwickelt, keine Konidien, kein Geruch. Von Wägung wurde abgesehen.

17. Aspergillus niger im Brutschrank vom 25. April bis 28. Mai 1901. Vier Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Harnstoff. Nur sehr minimal gekeimt. Ernte Null.

18. Aspergillus niger im Brutschrank vom 25. April bis 29. Mai 1901. Vier Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Harnstoff und 1,5 g Saccharose. Decken zusammenhängend, schwarz, doch stellenweise die Konidien dünner stehend. Decke nicht faltig. Ernte in Milligramm: 180,3; 200,8; 198,3; 258,5.

19. Aspergillus niger im Brutschrank vom 10. bis 29. Mai 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Ammonium-n-butyrat. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g n-buttersaures Ammon und 1,5 g Rohrzucker. Keine Kultur aufgegangen.

20. Aspergillus niger im Brutschrank vom 11. bis 31. Mai 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g β-oxybuttersaurem Ammoniak. Viele bis erbsengrofse Pilzbällchen mit lichtgefärbten Konidien und weifsem Rand (I, II, III). Ferner drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g β-oxybuttersaurem Ammon und 1,5 g Rohrzucker. Dicke prachtvolle Decke (IV, V, VI). Erntegewichte in Milligramm:

I. . . .	73,8	IV. . . .	501,1
II. . . .	112,4	V. . . .	487,9
III. . . .	93,1	VI. . . .	508,0

21. Aspergillus niger im Brutschrank vom 12. Mai bis 5. Juni 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g glykolsaurem Ammoniak. Sehr dünne, gleichmäfsige, durchsichtige Pilzdecke; Konidien in sehr mäfsiger Menge (I, II, III). Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g glykolsaurem Ammon und 1,5 g Saccharose. Schöne Decke mit vielen Konidien und weifsem faltigen Mycel (IV, V, VI). Erntegewichte in Milligramm:

I. . . .	7,3	IV. . . .	395,6
II. . . .	9,6	V. . . .	340,0
III. . . .	21,5	VI. . . .	412,3

22. Aspergillus niger im Brutschrank vom 13. Mai bis 5. Juni 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Acetamid. Dunkelbraune, dicke, getrennte Räschen in gröfserer Anzahl. Acetamidgeruch (I, II, III). Ferner drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Acetamid und 1,5 g Saccharose vom 13. Mai bis 7. Juni 1901. Zusammenhängende schöne Decke, doch schleimig, kein festes Mycel. Kein Acetamidgeruch (IV, V, VI). Erntegewichte in Milligramm:

I. . . .	56,2	IV. . . .	513,8
II. . . .	42,3	V. . . .	530,1
III. . . .	47,2	VI. . . .	529,3

23. Aspergillus niger im Brutschrank vom 16. Mai bis 7. Juni 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Acetonitril.

Dünne lockere Decke mit zerstreuten Konidien (I, II, III). Ferner drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Acetonitril und 1,5 g Rohrzucker. Untergetauchtes Mycel, sehr wenig Konidien (IV, V, VI). Erntegewichte in Milligramm:

I. . . .	34,2	IV. . . .	9,7
II. . . .	30,5	V. . . .	8,2
III. . . .	30,0	VI. . . .	9,9

24. Aspergillus niger im Brutschrank vom 18. Mai bis 12. Juni 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Propionamid. Nichts gewachsen. Ferner drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Propionamid und 1,5 g Rohrzucker. Schollige, dicke, weiſse Rasen mit inselförmig angeordneten hellbraunen Konidien. Erntegewichte in Milligramm: 308,9; 190,2; 124,2.

25. Aspergillus niger im Brutschrank vom 27. Mai bis 17. Juni 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Sarkosin und 1,5 g Rohrzucker. Kompakte Decke mit vielen Konidien und schleimigem Mycel. Erntegewichte in Milligramm: 145,7; 149,9; 151,0.

26. Aspergillus niger im Brutschrank vom 28. Mai bis 17. Juni 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Propionitril, ferner drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Propionitril und 1,5 g Rohrzucker. Nichts gewachsen.

27. Aspergillus niger im Thermostaten vom 29. Mai bis 20. Juni 1901. Eine Kultur mit 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Aminobuttersäure und 1,5 g Rohrzucker. Schöne Pilzdecke mit 494,9 mg Trockengewicht.

28. Aspergillus niger im Brutschrank vom 29. Mai bis 20. Juni 1901. Eine Kultur mit 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Kreatin und 1,5 g Rohrzucker. Dünne Decke von 26,6 mg Trockengewicht.

29. Aspergillus niger im Brutschrank vom 30. Mai bis 20. Juni 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Isovaleramid. Nichts gewachsen. Ferner drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Isovaleramid und 1,5 g Saccharose. Wenige weiſse Pilzflocken. Trockengewichte in Milligramm: 7,2; 4,4; 1,2.

30. Aspergillus niger im Brutschrank vom 6. bis 26. Juni 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g salzsaurem Betain und 1,5 g Rohrzucker. Dicke Pilzdecke, doch konidienarm und mit einem eigentümlichen schwefelgelben Farbstoffe. Erntegewichte in Milligramm: 655,4; 660,2; 646,2.

31. Aspergillus niger im Brutschrank vom 6. bis 26. Juni 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Thioharnstoff und 1,5 g Saccharose. Nichts gewachsen.

32. Aspergillus niger im Brutschrank vom 7. bis 29. Juni 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Karbaminsäureäthylester (Urethan) und 1,5 g Rohrzucker. Konidienarme, gelbliche, lückenhafte Pilzdecke. Erntegewichte in Milligramm: 189,4; 149,6; 199,2.

33. Aspergillus niger im Brutschrank vom 7. Februar bis 1. März 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Aspara-

gin und 1,5 g Rohrzucker. Schon nach 14 Tagen schöne Konidiendecke; bei Einerntung schöne normale Decke (I, II, III). Ferner drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 1,5 g Rohrzucker und 0,5 g bernsteinsaurem Ammon. Nach 14 Tagen Decke dicht und weifs; nach 21 Tagen massive Decke mit guter Konidienbildung (IV, V, VI). Erntegewichte in Milligramm:

I. . . .	579,2	IV. . . .	403,2
II. . . .	601,3	V. . . .	241,3
III. . . .	595,5	VI. . . .	561,8

34. Aspergillus niger im Thermostaten vom 2. bis 26. März 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Asparagin (I, II, III). Ferner drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Ammoniumsuccinat (IV, V, VI). Alle Kulturen gleich: Decke gleichmäfsig mit dünnem Konidienüberzug und schleimigem, zusammenhängendem Mycel. Erntegewichte in Milligramm:

I. . . .	21,6	IV. . . .	54,9
II. . . .	18,6	V. . . .	53,0
III. . . .	22,2	VI. . . .	verunglückt

35. Aspergillus niger im Brutschrank vom 17. März bis 9. April 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 1,5 g Rohrzucker und 0,5 g Asparagin. Schön entwickelte Rasen mit dickem weifsen Mycel und sehr reichlichen Konidien (I, II, III). Ferner drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 1,5 g Rohrzucker und 0,5 g Ammonsuccinat. Aussehen wie bei ersteren drei Kulturen, nur mehr homogen ausgebreitet, während I bis III Polster bilden (IV, V, VI). Erntegewichte in Milligramm:

I. . . .	541,9	IV. . . .	576,8
II. . . .	568,6	V. . . .	483,1
III. . . .	550,7	VI. . . .	488,5

Gesamt-N-bestimmung nach Kjeldahl ergab in Prozenten der Trockensubstanz:

I. . . .	10,086	IV. . . .	10,141
II. . . .	10,287	V. . . .	9,329
III. . . .	10,447	VI. . . .	9,422

36. Aspergillus niger im Brutschrank vom 30. Mai bis 20. Juni 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Bernsteinsäurenitril. Ferner drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Bernsteinsäurenitril und 1,5 g Rohrzucker. Kein Wachstum.

37. Aspergillus niger im Brutschrank vom 1. bis 20. Juni 1901. Drei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g cyanessigsaurem Natrium (Halbnitril der Malonsäure). Dünne Pilzdecke (I, II, III). Ferner eine Kultur mit 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g cyanessigsaurem Natron und 1,5 g Rohrzucker. Dünne Decke (IV). Erntegewichte in Milligramm:

I. . . .	25,5	III. . . .	33,8
II. . . .	32,4	IV. . . .	33,6

38. Aspergillus niger im Brutschrank vom 2. bis 23. Juni 1901. Zwei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Ammoniummalonat und 1,5 g Rohrzucker. Dicke Pilzdecke (I, II). Ferner zwei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g malonsaurem Ammon. Dünne Decke (III, IV). Erntegewichte in Milligramm:

I. . . .	514,3	III. . . .	16,3
II. . . .	489,3	IV. . . .	20,8

39. Aspergillus niger im Brutschrank vom 27. Mai bis 17. Juni 1901. Zwei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung und 2 g Amygdalin (Diglykosid des Phenylglykolsäurenitrils). Schöne Pilzdecke. Erntegewichte: 48,5 und 24,0 mg.

40. Aspergillus niger im Thermostaten vom 13. Juni bis 2. Juli 1901. Zwei Kulturen mit je 50 ccm Mineralsalzlösung, 0,5 g Pepton Witte und 1,5 g Rohrzucker. Dicke Pilzdecke mit vielen Konidien. Trockensubstanz in Milligramm: 514,5 und 541,0.

XXXIII.

Ueber Guanidinzersetzung im Tierkörper.

Von Dr. **Ernst Pommerrenig**, Assistent.

(Aus dem pharmakol. Institut der deutschen Universität zu Prag.)

Die Thatsache, dafs fast in allen Eiweifskörpern durch die vielfachen Untersuchungen von Schultze, Hedin, Kossel, Kutscher das Guanidinderivat Arginin nachgewiesen worden ist, lenkt die Aufmerksamkeit von Neuem auf die bisher meist nur vom toxikologischen Standpunkte aus untersuchte Base Guanidin. Erinnert man sich, dafs Methylguanidin bei der Digestion von Kreatin mit Quecksilberoxyd entsteht, dafs die Konstitution mancher Purinderivate Beziehungen zum Guanidin erkennen läfst, so ist es von vornherein nicht unmöglich, dafs dasselbe auch bei vitalen Prozessen, z. B. Zerfall und Synthese von Kreatin, von Guanin, Arginin, kurz im intermediären Stoffwechsel eine Rolle spielt. Ferner macht die Giftigkeit des Guanidins sowie des sich nach Brieger*) bei Pferdefleischfäulnis bildenden Methylguanidins den Wunsch nach einer rationellen, auf dem Schicksal der Base beruhenden Entgiftung rege. Die Verfolgung dieser und ähnlicher Fragen setzt aber eine quantitative Guanidinbestimmung in tierischen Flüssigkeiten voraus, deren Ausarbeitung und Erprobung ich nachstehende Versuche widmete.

I.

Gergens und Baumann**) geben auf Grund qualitativer Reaktionen an, dafs das Guanidin nur zum kleineren Teil unverändert mit dem Harn ausgeschieden wird. Auch Jordan***), der letzte Autor, welcher Guanidinderivate nach pharmakologischer Seite hin studierte, begnügte sich, mit qualitativen Reaktionen

*) Untersuchungen über Ptomaine III, S. 33.

**) Pflügers Archiv 12, 205.

***) Arbeiten aus dem pharm. Inst. zu Dorpat 12, 254.

den teilweisen Übergang des Guanidins, des Amido- und Benzalamidoguanidins in den Harn nachzuweisen.

Zur quantitativen Guanidinbestimmung empfiehlt Emich*) Wägung des Guanidinpikrates. Dieses Verfahren, direkt auf den Harn angewendet, bewährte sich jedoch nicht; es mufste daher in Einzelheiten und zwar in folgendem Sinne verändert werden.

Der abgemessene Harn wird, am besten in einem entsprechenden Mafscylinder, zuerst mit neutralem, sodann mit basischem Bleiacetat ausgefällt; im Filtrat wird das Blei mit Schwefelwasserstoff, dieser selbst mittels eines Luftstromes entfernt, hierauf von dem neuerlichen Filtrate ein aliquoter Teil mit Natronlauge neutralisiert und mit dem gleichen Volumen kalt gesättigter Pikrinsäurelösung ausgefällt. Der entstandene Niederschlag, der unter dem Mikroskop charakteristische Krystalle — Prismen mit schräg abgestutzten Endflächen, die sich unter rechtem Winkel zu zierlichen Flechtwerken aneinanderlegen — zeigt, wird nach mehrstündigem Stehen auf das Filter gebracht, mit gesättigter Pikrinsäurelösung gewaschen, dann in einen kleinen Scheidetrichter gespült und mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt; die Pikrinsäure wird mit Chloroform ausgeschüttelt, die zurückbleibende, völlig farblose, wässerige Guanidinsulfatlösung zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl benutzt und aus dem erhaltenen Wert das Guanidin berechnet. Normaler Harn giebt ohne Guanidinzusatz mittels obigen Verfahrens keinen Pikratniederschlag.

Die Verläfslichkeit der Methode erhellt aus Tabelle I.

Tabelle I.

5 cm³ einer wässerigen Guanidinlösung ergeben bei direkter Bestimmung ihres Stickstoffgehaltes n. Kjeldahl	a) 0,0233 g N	b) 0,0234 g N
5 cm³ dieser Lösung mit Pikrinsäure gef. u. s. w. wie oben angegeben .	a) 0,0229 „ „	b) 0,0234 „ „
5 cm³ Lösung ergeben direkt	a) 0,0168 „ „	b) 0,0169 „ „
5 cm³ dieser Lösung mit Pikrinsäure gef. u. s. w.	a) 0,0165 „ „	b) 0,0165 „ „
5 cm³ Lösung ergeben direkt	a) 0,0198 „ „	b) 0,0198 „ „
5 cm³ dieser Lösung mit Pikrinsäure gef. u. s. w.	a) 0,0193 „ „	b) 0,0193 „ „
50 cm³ Kaninchenharn + 0,05 g Guanid. carb. = 0,0233 g N nach obiger Methode behandelt	a) 0,0235 „ „	b) 0,0237 „ „
50 cm³ Hundeharn + 0,1946 g Guanid. carb. = 0,0906 g N durch 24 Stunden faulen gelassen und dann nach obiger Methode behandelt	0,0923 „ „	

*) W. Monatshefte f. Chemie 1891, S. 23.

II.

Zur Feststellung des Schicksals des Guanidins im tierischen Organismus wurde dasselbe teils subkutan, teils per os in der Form des wasserlöslichen Karbonates gereicht.

Kaninchen gingen bei beiden Applikationsarten nach Gaben von 0,5 g des Salzes pro Kilogramm bereits nach drei bis fünf Stunden unter den bekannten Krampferscheinungen zu Grunde. Als erstes Vergiftungssymptom beobachtet man wiederholte Schleckbewegungen der Zunge ohne deutliche Salivation, zu denen sich bald eigentümliche Schüttelbewegungen des Kopfes und der Ohren hinzugesellen. Tastet man in diesem Stadium die obere Nackengegend ab, so fühlt man eine feinschlägige Zitter- oder Flimmerbewegung der Muskulatur, die sich allmählich über den ganzen Körper verbreitet. Bei Gaben von 0,4, ja 0,3 g pro Kilogramm erliegen die Tiere in der Regel erst nach 48 Stunden der Intoxikation; dabei sieht man den ersten halben bis ganzen Tag gar keine Erscheinungen; erst am zweiten Tage entwickeln sich Krämpfe, die nach mehrstündigem Andauern zum Tode führen. Bedenkt man, dafs das Guanidinkarbonat eine leicht diffusible Substanz ist, die alsbald in den Harn übergeht, dann ist diese eigentümliche Inkubation nur so zu erklären, dafs entweder die spezifischen Veränderungen in den nervösen Zentralorganen erst allmählich entstehen können — wogegen die akuten Intoxicationen bei intravenöser Injektion sprechen — oder aber, dafs die Ausscheidung oder Verarbeitung des Giftes absinkt, wodurch erst nach und nach die toxische Giftkonzentration im Blute bezw. im Nervensysteme erreicht wird.

Um ein sicheres Urteil über die Ausscheidungsverhältnisse des Guanidins zu gewinnen, mufsten die Dosen noch kleiner als die oben angeführten gewählt werden, ein Umstand, der wieder in anderer Richtung störend in die Untersuchung eingriff. Bei Hunden und Hühnern wurden lediglich die Ausscheidungsverhältnisse verfolgt. Aus den Hühnerfaeces wurde das Guanidin in der Weise bestimmt, dafs dieselben unter Zusatz von alkoholischer Karbollösung gesammelt, nach dem Verreiben mit Gips bei 60° C. getrocknet, gleichmäfsig vermengt und dann bei 60° mit Wasser extrahiert wurden; die Extrakte wurden im Vakuum auf ein bestimmtes Volumen eingeengt und sodann wie der Harn behandelt. Die Versuchsresultate sind in Tabelle II (S. 565) zusammengestellt.

Die Versuche ergeben somit für Kaninchen das merkwürdige Resultat, dafs kleinste Dosen (0,05 g) vollständig, kleine (0,1 g) fast vollständig, der toxischen Grenze sich nähernde nur zum kleinsten Teile — analog den Erfahrungen Baumanns — ausgeschieden werden.

Werden nun die hier sowie bei den Hunden und Hühnern fehlenden Guanidinmengen etwa unter Harnstoffbildung zersetzt oder zurückgehalten und abgelagert oder umgewandelt? Hierfür auf dem Wege der Bestimmung der einzelnen Stickstoffkomponenten des Harns Aufklärung zu erhalten, war bei den geringen absoluten Werten von vornherein fast aussichtslos und so blieben denn auch thatsächlich derartige Versuche, am Huhn und Hund vorgenommen, wobei bei ersterem insbesondere die Kreatin- und Guaninmenge im Harn bestimmt wurde, ohne Erfolg.

Ebenso wenig brachte Ausspülung des Organismus durch grofse Flüssigkeitsmengen nach beendeter Ausscheidung des Guanidins im Harn Aufklärung über den Verbleib der in der Bilanz fehlenden Menge.

Ich versuchte nunmehr, überlebende Organe auf Guanidin einwirken zu lassen, indem ich es dem Organbrei zusetzte und durch mehrere Stunden bei 40° C. von einem Motor schütteln liefs. Die Versuche ergaben die Unangreifbarkeit der Base unter diesen Bedingungen.

III.

Der Befund, dafs kleine Gaben unserer Base, wenigstens beim Kaninchen, zur Gänze wiedergefunden werden, ist nun für die Beurteilung der Annahme einer intermediären Guanidinbildung von Bedeutung: da im normalen Harn unserer Versuchstiere kein Guanidin gefunden, verfüttertes teils völlig, teils zum überwiegenden Teile ausgeschieden wird, so ist das Guanidin gewifs kein intermediäres Stoffwechselprodukt. Die Unangreifbarkeit des Guanidins gilt auch von seinen Derivaten: das Kreatin wird nach Meissner und Voit quantitativ ausgeschieden und eigene mit Methylguanidin angestellte Versuche ergaben mir ebenfalls unveränderten Übergang desselben in den Harn. Überträgt man diese Erfahrungen auf das Arginin, die Guanidinamidovaleriansäure, so wird vielleicht — wie noch durch Versuche zu erhärten sein wird — folgende Vorstellung über sein Schicksal gestattet sein: da sich im normalen Harn weder Arginin noch Guanidin vorfindet, so wird Arginin im intermediären Stoffwechsel entweder überhaupt nicht

Tabelle II.

Nummer	Tierart	Gewicht g	Harn der ersten	Dos. tot.	Dos. per kg g	Ausgeschieden in Gramm	Ausgeschieden in Proz.	Anmerkung
1.	Kaninchen	970	36 Stunden	0,05 g per os	0,05	0,0501	100	—
2.	„	1560	48 „	0,083 „ subkutan	0,05	0,0755	91	—
3.	„	1320	48 „	0,132 „ „	0,1	0,1152	87,3	—
4.	„	1550	48 „	0,155 „ per os	0,1	0,127	82	—
5.	„	1350	72 „	0,1 „ subkutan	0,074	0,075	75	—
6.	„	1400	48 „	0,21 „ intraven.	0,15	0,0997	48	—
7.	„	1300	48 „	0,248 „ per os	0,19	0,172	69	—
8.	„	920	48 „	0,184 „ subkutan	0,2	0,0995	54	—
9.	„	1350	48 „	0,375 „ „	0,3	0,1103	30	—
10.	„	1240	48 „	0,496 „ per os	0,4	0,1369	23	Tod
11.	„	1320	32 „	0,66 „	0,5	0,1927	23	Tod
12.	Hund	5750	48 „	0,5 „ per os	—	0,2764	55	—
13.	Hündin	3820	72 „	1,0133 „ subkutan	—	0,535	53	—
14.	Hund	5500	48 „	0,2858 „ „	—	0,121	43	—
15.	Hahn	1680	48 „	1,001 „ per os	—	0,649	65	—
16.	„	1400	48 „	0,4248 „ subkutan	—	0,2551	60	—

frei, oder aber es wird bei seiner Oxydation durch den Tierkörper die Guanidinbildung vermieden. Um ein eventuelles Auftreten von Guanidin als Spaltungsprodukt des Arginins nachzuweisen, habe ich in Anlehnung an die Angaben von Fr. Müller*), der unter den autolytischen Produkten pneumonischer Lungen einen Körper isolierte, der nach seinem Verhalten zu Baryt und Silbernitrat mit Wahrscheinlichkeit als Arginin anzusprechen war, den Harn eines sechzehnjährigen Pneumonikers, der während der ersten zwölf Stunden nach Lösung einer typischen croupösen Pneumonie ausgeschieden wurde, auf Guanidin untersucht: das Resultat war ein negatives. Wenn daher Kutscher**) nach seiner die Oxydation des Arginins betreffenden Mitteilung Guanidin und Bernsteinsäure als Oxydationsprodukte erhielt und die Bildung derselben Produkte in vivo annimmt, so stehen dem in gewisser Richtung meine Versuchsresultate an Tieren entgegen.

Hier sei auch kurz angeführt, dafs es mir nicht gelang im Sinn der Angaben von F. Lossen durch Oxydation von Eiereiweifs oder Casein mit Permanganat auch nur eine Spur Guanidin zu erhalten.

Die Giftwirkung, die das Guanidin im Vergleich mit Harnstoff entfaltet, regte an, weitere Stoffe, die sich gleich den genannten gesamtanalytisch nur durch Ersatz eines Sauerstoffs durch die =NH-Gruppe unterscheiden, experimentell auf ihre Giftigkeit zu prüfen.

Ich wählte das Benzamidin, $C_6H_5 . C\leqslant^{NH}_{NH_2}$, und Acetamidin, $CH_3 . C\leqslant^{NH}_{(NH_2)}$, im Vergleich zum Benzamid und Acetamid. Beide Substanzen waren in der doppelten toxischen Guanidindosis für Kaninchen indifferent. Das Acetamidin ging quantitativ in den Harn über, während vom Acetamid, das zu 0,96 und 0,87 g subcutan an Tiere von 1980 und 1750 g verabfolgt wurde, nichts im Harn wieder erschien; Acetamid ist somit in kleinen Dosen wohl völlig verbrennbar, was, mit Rücksicht auf ältere Angaben, eigens hervorgehoben sei.

*) Fr. Müller, Über die chemischen Vorgänge bei der Lösung der Pneumonie. Verhandl. d. naturforsch. Gesellschaft Basel 1901.

**) Zeitschr. f. phys. Chem. 32, 276 u. 413.

XXXIV.

Einige Bemerkungen über die Zuckerbildung aus Proteinstoffen.

Von **Oscar Loew.**

Eine der interessantesten Fragen der chemischen Physiologie ist die nach der Zuckerbildung aus Proteinstoffen im tierischen Organismus. Seit lange ist bekannt, dafs auch bei blofser Fütterung mit Fleisch die Glykogenbildung in der Leber, die Milchzuckerbildung in der Milchdrüse säugender Karnivoren, sowie die Zuckerbildung im Diabetiker andauert, und zwar in einer solchen Ausdehnung, dafs der geringe Glykogengehalt der Leber und des Fleisches nicht dafür verantwortlich gemacht werden kann. Als nun in neuester Zeit die interessante Entdeckung gemacht wurde, dafs aus gewissen Proteinstoffen bei mehrstündigem Kochen mit verdünnter Salzsäure eine Kohlehydratgruppe sich abspalten läfst, konnte dies bei manchen anfangs den Glauben erwecken, dafs nun jenes Rätsel gelöst sei, um so mehr als Schöndorff beobachtete, dafs blofs solche Proteinstoffe Glykogenbildung im Kaltblüter (Frosch) herbeiführen können, aus welchen durch verdünnte Salzsäure eine Kohlehydratgruppe sich abspalten läfst, was Blumenthal und Wohlgemuth*) bestätigten. Beim Warmblüter aber ist die Sachlage eine andere, wie Versuche von Bendix**) ergaben. Kasein und Leim, aus welchen sich mittels verdünnter Salzsäure keine Kohlehydratgruppe abspalten läfst, lieferten hier etwa ebenso viel, das erstere sogar noch etwas mehr Zucker resp. Glykogen als das Ovalbumin, welches eine Kohlehydratgruppe bei Behandlung mit verdünnten Säuren liefert.

*) Berl. klin. Wochenschr. **38**, 391 (1901).

) Zeitschr. f. physiol. Chem. **32, 479 (1901).

Was zunächst jene künstlich abspaltbare Kohlehydratgruppe betrifft, so haben Krawkow, ferner Blumenthal und Mayer*) dargethan, dafs dieselbe nur glykosidartig gebunden ist und keineswegs aus einer Zertrümmerung des eigentlichen Proteinkomplexes stammt, ferner hat Langstein**) gezeigt, dafs beim krystallisierten Ovalbumin jene „Kohlehydratgruppe" aus Glukosamin besteht und höchstens 10 bis 11 Proz. jenes Proteinstoffes ausmacht. Glukosamin ist aber nach Fabian und nach Bendix zur Glykogenbildung im Warmblüter nicht geeignet.

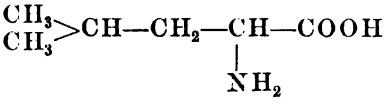
Nach O. Weifs***) besteht die Kohlehydratgruppe des Ovalbumins aus einer Methylpentose, indessen hat derselbe nicht den krystallisierbaren, sorgfältigst gereinigten Anteil des Ovalbumins verwendet, sondern das Rohprodukt nach Entfernung des Ovomukoids.

Quantitative Beziehungen, welche beim Warmblüter zu Tage traten, liefsen schon vor den Versuchen von Bendix viele daran zweifeln, ob es die durch verdünnte Säuren aus manchen Proteinstoffen abspaltbare Kohlehydratgruppe sei, welche die bedeutende Zucker- und Glykogenbildung bei blofser Proteinfütterung erklären könne. So äufserte sich z. B. Cohn†) wie folgt: „Zwar ist es in letzter Zeit mehrfach gelungen, aus Eiweifs resp. bestimmten Eiweifsverbindungen Zucker abzuspalten, aber selbst wenn dieser Zucker aus dem eigentlichen Eiweifsmolekül stammt, so sind doch die Mengen, die man erhalten hat, so gering, dafs sie die sehr grofsen Quantitäten Zucker, die im Stoffwechsel aus Eiweifs entstehen und die nach manchen Berechnungen 60 Proz. und mehr betragen können, absolut nicht erklären."

Cohn sowie Müller und Seemann kamen daher zur Vermutung, dafs es das aus Proteinstoffen in gröfserer Menge durch Salzsäure oder Trypsin zu erhaltende Leucin sei, welches im Tier in Zucker umgewandelt werden könnte. Cohn (l. c.) meint: „Der Tierkörper bedürfte, um Leucin in Traubenzucker überzuführen, gar nicht einmal komplizierter Synthesen, sondern es handelte sich nur um Oxydationen, Abspaltung der Amidogruppe und Reduktion, d. h. dreier Prozesse, die derselbe nach den vorliegenden Thatsachen sehr wohl auszuführen vermag." Ferner meint er: „Ein Vergleich der Konstitution des Leucins mit derjenigen der Glukose

*) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 32, 274 (1899).
**) Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 49 (1900).
***) Zentralbl. f. Physiol. 12, 515 (1898).
†) Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 208 (1899).

ergäbe nahe Beziehungen.“ Hiergegen läfst sich vor allem der Einwand erheben, dafs das aus Proteinstoffen erhaltene Leucin nach den Forschungen E. Schulzes keine normale Kohlenstoffkette enthält, sondern Isobutylamidoessigsäure ist:



Es würde also aufser der fünffachen Hydroxylierung, Abspaltung der Amidogruppe und Reduktion der Karboxyl- zur Aldehydgruppe auch noch Verschiebung eines Methyls zur Bildung einer normalen Kohlenstoffkette notwendig sein, eine Summe von Umwandlungen eines Moleküls, welche manche Unwahrscheinlichkeit einschliefst. Cohns Bestimmungen des Leberglykogens nach Fütterung ausgehungerter Kaninchen mit Leucin haben denn auch, wie Cohn selbst zugiebt, kein recht entscheidendes Resultat ergeben. Auch Bendix (l. c.) und andere Autoren gelangten zum Schlusse, dafs das Leucin nicht wohl die Quelle der Zuckerbildung aus Proteinstoffen beim Warmblüter sein könne.

Welches dürfte nun der Modus der Zuckerbildung aus Proteinstoffen beim Warmblüter sein? Es bleiben meiner Ansicht nach nur zwei Wege übrig, von denen aber der eine den anderen nicht auszuschliefsen braucht. Beide Bildungsweisen könnten nebeneinander verlaufen.

I. Es kann die Gruppe CHOH aus dem Proteinmolekül — eventuell nach vorheriger Bildung aus einer CH_2-Gruppe — abgespalten und im status nascens zu Glykose kondensiert werden, eine Synthese, welche ziemlich leicht erfolgen könnte, wie das Verhalten des Formaldehyds gegen Kalk- und Bleioxyd ergiebt. Eine solche synthetische Bildung hatte schon vor längerer Zeit Pflüger*) für das Glykogen in der Leber angenommen, da einerseits verschiedenartige Substanzen zur Glykogenbildung tauglich, andererseits besonders Drüsen zu erheblichen chemischen Leistungen befähigt sind. In neuester Zeit hat ferner Münch**) dargethan, dafs auch Formose im Kaninchenorganismus Glykogen zu liefern vermag. Die von mir zuerst dargestellte Rohformose enthält aber zu 80 bis 85 Proz. und darüber einen einheitlichen Zucker, die wahre Formose, welchem keine normale Kohlenstoffkette zukommen

*) Pflüg. Archiv 42, 10.

**) Zeitschr. f. physiol. Chem. 29, 507.

kann*), was eine direkte Umwandlung in Glykose unter Atomverschiebung unwahrscheinlich macht**). Wenn nun die Gruppe CHOH in gröfserer Anzahl aus einem Proteinkomplex abgespalten wird, wäre eine beträchtliche Zuckerbildung ermöglicht. Sollte jene Gruppe auch in Molekülen von Fettsäuren entstehen und abgespalten werden, so würde auch die von Seegen und von Weiss beobachtete Zuckerbildung aus Fett (eventuell eine Zuckerbildung aus Leucin) die natürlichste Erklärung finden; denn jene Synthese durch Kondensation ist weit wahrscheinlicher als eine Bildung von fünf Hydroxylgruppen an fünf aneinanderhängenden Kohlenstoffatomen durch oxydierende Einflüsse.

II. Es ist denkbar, dafs der Proteinkomplex Atomgruppen enthält, welche unter gewissen im Tierkörper realisierten Einflüssen leicht zu Glukose umgewandelt werden können, ohne jede weitere synthetische Operation. Hierbei müfste freilich der Stickstoff in Form sehr stickstoffreicher Körper [vielleicht als Ammoniak, Kreatin und Purinbasen***)?] abgespalten werden. Eine solche Ansicht der direkten Zuckerbildung aus Proteinstoffen ist allerdings mit der heutzutage herrschenden Anschauung nicht zu vereinbaren, nach welcher sämtliche mit Salzsäure oder Trypsin erhaltenen Produkte vorgebildet im Proteinkomplex vorhanden wären.

Aus einem riesigen Konglomerat von in Harnstoff- resp. Guanidinform†) gezwängten Radikalen entstünden hiernach durch blofse hydrolytische Spaltung: Tyrosin, Phenylamidopropionsäure, Leucin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Glykokoll, Cystein, Arginin, Lysin, Histidin, Proteinchromogen und nach der neuesten Mitteilung E. Fischers α-Pyrrolidinkarbonsäure. Ein solcher Komplex dürfte aber keineswegs zu den Leistungen der lebenden Substanz befähigt

*) Vergl. Chem.-Ztg. 1897, Nr. 26; ferner 1899, Nr. 51. Dort habe ich auch die Gründe angegeben, warum der Formose Ketonnatur zugeschrieben werden mufs.

**) Blofs solche Atomverschiebungen gehen unter sonst günstigen Bedingungen leicht vor sich, bei denen Wärmeentwickelung stattfindet, also wenn ein relativ labiler Körper durch Atomumlagerung zu einem stabileren wird.

***) Dafs Purinbasen nicht nur aus den Nukleinen der Nahrung in den Tierkörper gelangen, sondern auch [wie ich früher bereits vermutet hatte (Journ. prakt. Chem. 31, 131)] aus dem Proteinkomplex im tierischen Stoffwechsel gebildet werden, haben Burian und Schur bewiesen.

†) Die neuesten Bestimmungen von Habermann und Ehrenfeld dürften jedoch eine Widerlegung dieser Ansicht enthalten. Zeitschr. f. physiol Chem. 30, 453 (1900).

sein. In den organisierten aktiven Proteinmassen des Protoplasma mufs es höchst labile Atomgruppen geben, welche fähig sind, chemische Energie zu übertragen, Oxydationen zu veranlassen und die gewonnene Wärmeenergie wieder in andere Energieformen umzusetzen. Wo sind denn diese Gruppen nach den heutigen Anschauungen über den Aufbau der Proteinkörper?

Die Ansicht, dafs Trypsin nur hydrolytisch spalten könne, ist nicht erwiesen, sondern wird nur aus Analogie mit anderen Enzymen geschlossen. Nach meiner schon früher geäufserten Ansicht handelt es sich bei der Wirkung des Trypsins, ebenso wie bei der von Salzsäure um Spaltungen, denen bedeutende Atomverschiebungen vorausgehen. Ob eine Spaltung blofs hydrolytisch erfolgt oder nach vorausgehenden, oder unter gleichzeitigen Atomverschiebungen hängt, ceteris paribus, lediglich von dem Grade der Stabilität einer Verbindung ab. Die Festigkeit von Kohlenstoffketten kann unter Umständen eine recht schwache sein, wie z. B. das Verhalten der Acetessigsäure oder des Diacetonamins lehrt. In der Glukose ist die Kohäsion schwächer als im Leucin oder in der Kapronsäure.

Ein Körper ferner, der bei geringfügigen Einflüssen nur hydrolytisch gespalten wird, kann bei Steigerung derselben auch unter Atomverschiebung tiefer gespalten werden. So wird z. B. Maltose durch verdünnte Natronlauge nur hydrolytisch gespalten, durch konzentrierte aber unter Milchsäurebildung u. s. w. weiter verändert. Salzsäure spaltet Fruktose oder Glykose in Huminsäure, Lävulinsäure, Ameisensäure, Furfurol und Kohlensäure, was eine recht beträchtliche Atomverschiebung involviert.

Wenn nun ein Proteinstoff mit Salzsäure oder Schwefelsäure oder Trypsin behandelt wird, so ist die Neigung zu bestimmten Atomneugruppierungen so grofs, dafs stets nahezu die gleichen Mengen der „Spaltungsprodukte“ erhalten werden. Es können aber auch Ausnahmen von dieser Regel existieren und dann ist das Resultat mit der Annahme einer blofs hydrolytischen Spaltung absolut nicht zu vereinbaren. Eine solche recht interessante Ausnahme existiert aber. Kasein liefert nämlich bei Spaltung mit Salzsäure 29 Proz. Glutaminsäure*) (Hlasiwetz und

*) Nach der neueren Mitteilung von E. Fischer werden nur 10 Proz. Glutaminsäure-Hydrochlorat bei der Salzsäurespaltung erhalten; indessen, es wurde hier das Zinnchlorür weggelassen, welches die oben genannten Forscher der Salzsäure zusetzten. Es wäre von Interesse, festzustellen, ob dieser Zusatz die quantitativen Resultate zu beeinflussen vermag.

Habermann), bei Spaltung mit Schwefelsäure aber nur 1,8 Proz. (Kutscher). Die Frage, was nun hier statt der restierenden 27,2 Proz. Glutaminsäure auftritt, wurde bisher nicht weiter geprüft.

Nach meiner Ansicht könnte die Glutaminsäure ebenso wie Leucin und andere gesättigte „Spaltungsprodukte" aus ungesättigten Atomkomplexen in ähnlicher Weise hervorgehen wie das Glykokoll aus Harnsäure bei der Spaltung mit Schwefelsäure. Es scheint mir ferner bezeichnend zu sein, dafs aus den Proteinstoffen bei der Zersetzung mit Säuren oder Trypsin Körper gewonnen werden, von denen mehrere einander ziemlich nahe stehen, wie z. B. Tyrosin und Phenylalanin, Lysin und Leucin, Arginin und α-Pyrrolidinkarbonsäure. Nach meiner Ansicht*) sind gewisse Atomgruppierungen mehrfach im Proteinmolekül vorhanden — da ich dieses als ein Kondensationsprodukt (des Asparaginsäurealdehyds) auffasse —, es kann deshalb die gleiche Atomgruppierung je nach der Natur der benachbarten Gruppen zu Tyrosin oder Phenylalanin werden und Lysin oder Leucin aus der gleichen ungesättigten Gruppe hervorgehen. Dasselbe gilt für Arginin, α-Pyrrolidinkarbonsäure und Amidovaleriansäure.

Nach der allgemein herrschenden Ansicht kommt ein hydroxylierter und ein nichthydroxylierter Benzolkern getrennt voneinander im Proteinmolekül vor, beide sonderbarerweise mit dem gleichen Reste der α-Amidopropionsäure verbunden!

Ferner wird von einigen ein allen Proteinen gemeinsamer Komplex angenommen, der die Rolle eines Kernes spielt, an den sich bald diese, bald jene Gruppe anlagert. Ja, jener aus Arginin, Lysin und Histidin zu Protamin vereinigte „Kern" soll schon an sich ein Eiweifskörper sein, obgleich er weder Schwefel enthält, noch Amidosäuren liefert, noch irgend welche ernährenden Eigenschaften hat, wie man sie von Eiweifskörpern verlangt.

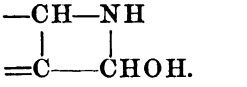
Eine in Bezug auf die Stickstoffbindung abweichende Meinung vertritt Jolles**). Nach dieser sind, je nach der Natur des Proteinstoffs, 45 bis 80 Proz. des Totalstickstoffs in der Form der .CO.NH-Gruppe vorhanden, da er nach der von ihm ausgearbeiteten Methode bei Oxydation von Proteinstoffen mit Kalium-

*) In meiner Schrift: Die chemische Energie der lebenden Zellen, München 1898, habe ich meine Ansicht ausführlicher begründet.

**) Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 361 (1901).

permanganat bei Anwesenheit von überschüssiger Schwefelsäure*) entsprechende Mengen Harnstoff erhielt. Diese Beobachtung erinnerte mich an eine früher von mir gemachte. Ich hatte gefunden, dafs, wenn dem Kaliumpermanganat so viel Schwefelsäure zugefügt wird, dafs dessen Kaliumgehalt völlig gebunden wird und auf 1 Tl. Eiweifs 4 Tle. des Permanganats genommen werden, beträchtliche Mengen Oxamid entstehen**). Es wäre nun nicht unmöglich, dafs die nämliche Gruppe, welche in meinem Falle Oxamid lieferte, bei dem abgeänderten Verfahren von Jolles zu Karbamid führt. Auch Oxaminsäure hatte ich damals (1885) als Oxydationsprodukt beobachtet, welche später von Halsey (1898) ebenfalls hierbei aufgefunden wurde. Von Interesse ist es, sich in diesem Zusammenhange daran zu erinnern, dafs die von Maly (1888) aus Ovalbumin erhaltene Peroxyprotsäure bei Spaltung mit Baryt viel Oxalsäure (24 Proz.) und Ammoniak liefert.

Man könnte Jolles einwenden, dafs die von ihm in den Proteinstoffen angenommene Gruppe .CO.NH. in den ersten Phasen der Oxydation erst aus anderen leicht oxydabeln Atomgruppen entsteht***). Eine solche wäre z. B. die nach meiner Eiweifsbildungshypothese zahlreich im Molekül passiver Proteinstoffe vorhandene Gruppe:



Der Chemismus der Harnstoffbildung im Tier ist ein anderer als der in den Versuchen von Jolles. Nencki und seine Mitarbeiter haben jene wichtige Frage völlig aufgeklärt. Ferner stehen die interessanten chemischen Beobachtungen Hofmeisters

*) Bei Oxydation in neutral gehaltener oder alkalischer Lösung entsteht Harnstoff nicht, wie früher schon verschiedene Chemiker gezeigt haben und auch ich gefunden hatte. Nur Béchamp hatte Harnstoff erhalten, was nur erklärlich ist, wenn er öfters Schwefelsäure bis zur stark sauren Reaktion zusetzte.

**) Journ. f. prakt. Chem. 31, 150 (1885). Ich äufserte damals die Vermutung, dafs dieses Oxamid ein Umwandlungsprodukt primär entstandener Blausäure sein möchte, wofür ich jedoch nur anführen konnte, dafs ein schwacher Blausäuregeruch zu beobachten war. Blausäure kann zu Dicyan oxydiert werden und dieses durch Wasseraufnahme leicht Oxamid liefern. Blausäure kann aber auch bei Behandlung mit Permanganat direkt in Harnstoff übergehen (Kossa, J. Th. 24, 78).

***) Vergl. noch O. Loew: Über die Stickstoffbindung in den Proteinstoffen, Chem.-Ztg. 1896, Nr. 101.

über Harnstoffbildung aus den verschiedenartigsten Materialien durch Oxydation mit Permanganat in Gegenwart von Ammoniak weit mehr mit den thatsächlichen Verhältnissen im Tierkörper im Einklang als die Oxydation der Eiweifskörper in schwefelsaurer Lösung.

Nach Nencki, Pawlow und Zaleski ist Karbaminsäure der Vorläufer bei der Harnstoffbildung*). Diese kann aus verschiedenen Amidosäuren hervorgehen, somit liefert $CH.NH_2$, also gerade die Gruppe, welche nach Jolles' Oxydationsmethode Harnstoff nicht liefert, im Tiere sehr leicht Harnstoff. In der Karbaminsäure haben wir die Gruppe $CO.NH_2$, aber dieselbe Gruppe im Acetamid und die Gruppe $CO.NH$ in der Hippursäure ist nicht zur Harnstoffbildung im Tier befähigt, woraus hervorgeht, dafs hier beim Generalisieren Vorsicht und Einschränkung am Platze ist. Sogar die der Karbaminsäure so nahe stehende Oxaminsäure geht bei Verfütterung nur zum kleinen Teil in Harnstoff über, besser allerdings, wenn subkutan dargereicht**).

Nachschrift.

Einige Wochen nachdem dieser Artikel abgesandt war, kam Heft 3 und 4 der Zeitschrift für physiologische Chemie hier an, in welchem Herr Prof. Fr. N. Schulz bedeutende Zweifel an den Resultaten von Jolles äufsert. Ähnliche Bedenken betreffs dieser Harnstoffbildung hatte auch ich, und es sollte mich nicht wundern, wenn es gar manchen anderen Kollegen ebenso gegangen wäre.

Tokio, im Oktober 1901.

O. Loew.

---

*) J. Th. 25, 176.

**) Leo Schwarz, J. Th. 28, 387. Wenn Oxaminsäure in Harnstoff übergeht, findet sich keine Oxalsäure im Harn, es wird also der Harnstoff nicht erst aus abgespaltenem Ammoniak gebildet (Schwarz). Wenn aber Formamid gefüttert wird, tritt eine entsprechende Menge Ameisensäure im Harne auf, es wird also der Harnstoff erst aus dem abgespaltenen Ammoniak gebildet (Halsey, J. Th. 28, 569), was gewifs von Interesse ist. Also Karbaminsäure

$HO.CO.NH_2$ geht direkt in Harnstoff über,
$H.CO.NH_2$ aber nicht.

XXXV.

Zur Kenntnis des Krötengiftes.

Von Dr. **Fr. Pröscher.**

(Aus dem königl. preufs. Institut für experim. Therapie, Frankfurt a. M.

Die zahlreichen Untersuchungen über das Krötengift, die namentlich von französischen und italienischen Forschern ausgeführt worden sind, haben noch nicht zu einem endgültigen Schlusse darüber geführt, ob wir es mit einem alkaloid- oder einem toxinähnlichen Stoff zu thun haben. In dem Hautsekret der verschiedenen Arten von Kröten ist eine Reihe von Körpern enthalten, die bis jetzt noch nicht eingehender untersucht sind, so bei der Knoblauchskröte ein knoblauchartig riechender Stoff, der noch nicht genauer indentifiziert ist. Ferner findet sich nach Calmels im Krötensekret Methylkarbylaminsäure und Methylkarbylamin, die auf das Nervensystem äufserst heftig wirken sollen. Von Kobert wurde mit dem Namen Phrynin ein Körper belegt, der die Schleimhäute äufserst heftig reizt. Phisalix und Betrand wollen aus dem Blutserum der gemeinen Kröte ein Alkaloid isoliert haben, indessen bleibt es zweifelhaft, ob dasselbe nicht ein Toxin war, da sie den Körper nicht in chemisch reiner Form darstellen konnten. Am Schlusse ihrer Untersuchungen sprechen sie selbst aus, dafs die Giftwirkung nicht allein auf dem vermeintlichen Alkaloid beruhe. Ebenso wollen Jornara und Casali aus dem eingetrockneten Krötengift das „Bufidin“ isoliert haben. Dasselbe soll krystallisierte Salze bilden und dementsprechend ein Alkaloid sein. Der alkoholische Auszug der Krötenhaut soll digitalisähnliche Wirkung haben. Pugliese fand, dafs das Krötengift Hämoglobin in Methämoglobin umwandle und dafs dasselbe die Blutkörperchen extra corpus löse. Genauere Untersuchungen hat Pugliese mit

dem Krötengift nicht angestellt. Mit welchen Arten von Kröten die Versuche ausgeführt wurden, war mir aus dem Referat, das mir über die Arbeit zur Verfügung stand, nicht ersichtlich.

Die folgende Untersuchung soll einen kleinen Beitrag zur Kenntnis des Krötengiftes liefern. Von einer genaueren Analyse desselben kann vorläufig keine Rede sein.

Gewinnung der Giftlösung.

Das zu meinen Untersuchungen benutzte Krötengift stammte von Bombinator igneus, der Feuerkröte, und von der gemeinen Gartenkröte, Bufo cinereus. Zur Gewinnung des Giftes wurde die Bauch- und Rückenhaut der frisch gefangenen Kröte benutzt, da es in der Haut in gröfster Menge vorhanden ist. Muskel und Blutserum der Feuerkröte enthalten es ebenfalls, aber in geringerer Quantität.

Die Kröten wurden, nachdem sie mit physiologischer Kochsalzlösung tüchtig abgespült waren, dekapitiert und dann enthäutet. Die Haut wurde dann nochmals mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült und mit Glaspulver zu einem möglichst homogenen Brei verrieben. Nach Zusatz von 2 bis 3 ccm physiologischer Kochsalzlösung wurde derselbe filtriert oder zentrifugiert. Die resultierende Flüssigkeit reagierte schwach sauer, war von grauweifser Farbe und von eigentümlichem, knoblauchartigem Geruch. Zur Konservierung wurde Toluol zugesetzt und die Flüssigkeit im Eisschrank aufbewahrt. Auf die gleiche Weise bereitete ich mir einen Auszug aus der Haut der Gartenkröte.

Der auf diese Weise gewonnene Auszug aus der Haut der Feuerkröte zeigt stark hämolytische Eigenschaften, der der Gartenkröte ebenfalls, wenn auch nur in Spuren (s. Tabelle III). Die folgenden Versuche beziehen sich nur auf das Gift der Feuerkröte, das wir kurzweg „Phrynolysin“ nennen wollen. Das Gift der Gartenkröte war nur zum Vergleich herangezogen.

Eigenschaften des Phrynolysins.

Das Phrynolysin ist ein äufserst labiler Körper. Erwärmen auf 56°, Stehenlassen am Licht, Zusatz von Alkohol, Äther, Chloroform, Mineralsäuren, starker Kalilauge, Pepsin und Trypsin zer-

stören es in kurzer Zeit. Eintrocknen über Phosphorsäureanhydrid bei Zimmertemperatur schwächt die Wirksamkeit des Phrynolysins bedeutend ab. (S. Tabelle V.) Das Phrynolysin dialysiert nicht. Da, wie bereits oben erwähnt, das Extrakt aus der Krötenhaut schwach sauer reagiert und zur Neutralisation 1 bis 1,3 ccm Zehntel-Lauge braucht, so könnte man annehmen, dafs die saure Reaktion das Toxin langsam zerstöre. Die Zerstörung des Toxins geht aber sowohl in neutraler wie in schwach saurer Lösung in der gleichen Zeit vor sich, so dafs die saure Reaktion keinen grofsen Einflufs ausübt. Die hämolytische Wirkung ist sowohl in saurer wie neutraler Lösung die gleiche.

Zur Konservierung eignet sich am besten Toluol, das zuerst von Ehrlich für die Konservierung der Toxine angewandt wurde, und Aufbewahrung im Eisschrank. Die Flüssigkeit trübt sich nach einiger Zeit durch Ausfallen von Eiweifs, bleibt aber in ihrer hämolytischen Kraft längere Zeit ungeschwächt. Nach ein bis zwei Monaten wird das Phrynolysin allmählich unwirksam. Von einer Reindarstellung kann bei der Labilität des Toxins vorläufig keine Rede sein, da schon das Eintrocknen bei Zimmertemperatur das Gift erheblich abschwächt. Eine pharmakologische Prüfung des Giftes konnte wegen Mangels an Apparaten nicht vorgenommen werden.

Einstellung des Phrynolysins auf verschiedene Blutarten.

Die Prüfung geschah so, dafs in eine Reihe von Reagenzröhrchen je 1 ccm der Verdünnung 1 : 10, 1 : 20 u. s. w. oder fallende Mengen des Giftes gegeben wurden, die Proben wurden durch Hinzufügen von 0,85 proz. Kochsalzlösung auf je 1 ccm aufgefüllt. Dazu kam je 1 ccm der fünfprozentigen Blutaufschwemmung in 0,85 Proz. Kochsalzlösung. Die Röhrchen blieben dann zwei Stunden bei 37° und über Nacht im Eisschrank. Als „komplette“ Lösung wurde im Folgenden stets diejenige Probe bezeichnet, welche beim Umschütteln keinerlei körperlichen Elemente mehr erkennen liefs; „fast komplett“, wenn noch ein geringes Sediment vorhanden war und „inkomplett“, wenn noch zahlreiche rote Blutkörperchen ungelöst waren. Es folgte dann „rot“, „Kuppe“, „Spur“, „0“. Von Tabelle III ab sind sämtliche Versuche mit Hammelblut ausgeführt.

Tabelle I.

Verdünnung	Hammelblut	Ziegenblut	Kaninchenblut	Hundeblut	Ochsenblut
1:20	komplett	komplett	komplett	komplett	Kuppe
1:40	„	„	„	„	„
1:80	„	„	„	rot	„
1:160	„	„	„	Kuppe	Spur
1:320	„	„	rot	„	0
1:640	„	„	„	„	0
1:1280	„	„	„	„	0
1:2560	„	inkomplett	Spur	„	0
1:5120	fast komplett	Kuppe	0	0	0
1:10240	rot	Spur	0	0	0
1:20480	Spur	0	0	0	0
1:40960	0	0	0	0	0

Verdünnung	Hühnerblut	Meerschweinchenblut	Rattenblut	Taubenblut
1:20	inkomplett	rot	rot	Spur
1:40	rot	„	Kuppe	0
1:80	„	Kuppe	„	0
1:160	0	Spur	Spur	0
1:320	0	0	0	0
1:640	0	0	0	0
1:1280	0	0	0	0
1:2560	0	0	0	0
1:5120	0	0	0	0
1:10240	0	0	0	0
1:20480	0	0	0	0
1:40960	0	0	0	0

Verdünnung	Taubenblut	Gänseblut	Froschblut	Krötenblut
1:20	Spur	rot	0	0
1:40	0	Kuppe	0	0
1:80	0	0	0	0
1:160	0	0	0	0
1:320	0	0	0	0
1:640	0	0	0	0
1:1280	0	0	0	0
1:2560	0	0	0	0
1:5120	0	0	0	0
1:10240	0	0	0	0
1:20480	0	0	0	0
1:40960	0	0	0	0

Tabelle II.

Phrynolysin der Gartenkröte.

Verdünnung	Hammelblut	Ziegenblut	Hundeblut	Kaninchenblut	Meerschweinchenblut	Ochsenblut
1:20	rot	0	rot	0	0	0
1:40	Spur	0	Kuppe	0	0	0
1:80	„	0	„	0	0	0
1:160	„	0	„	0	0	0
1:320	„	0	„	0	0	0
1:640	„	0	0	0	0	0
1:1280	„	0	0	0	0	0
1:2560	„	0	0	0	0	0
1:5120	„	0	0	0	0	0

Tabelle III.

Einstellung verschiedener Phrynolysine auf Hammelblut.

Verdünnung	Phrynolysin I	Phrynolysin II	Phrynolysin III
1:20	komplett	komplett	komplett
1:40	„	„	„
1:80	„	„	„
1:160	„	„	„
1:320	„	„	„
1:640	„	„	„
1:1280	„	„	„
1:2560	„	„	„
1:5120	„	„	fast komplett
1:10240	fast komplett	fast komplett	Kuppe
1:20840	Kuppe	rot	rot

Tabelle IV.

	Phrynolysin I	Phrynolysin II	Phrynolysin III	Phrynolysin IV
1,0	komplett	komplett	komplett	komplett
0,75	„	„	„	„
0,5	„	„	„	„
0,25	„	„	„	„
0,1	„	„	„	„
0,075	„	„	„	„
0,05	„	„	„	„
0,025	„	„	„	„

Tabelle IV. (Fortsetzung.)

	Phrynolysin I	Phrynolysin II	Phrynolysin III	Phrynolysin IV
0,01	komplett	komplett	komplett	komplett
0,0075	„	„	„	„
0,005	„	„	„	„
0,0025	„	„	„	inkomplett
0,001	inkomplett	„	„	Kuppe
0,00075	rot	„	„	0
0,0005	Kuppe	„	„	0
0,00025	0	„	„	0
0,0001	0	inkomplett	rot	0

Tabelle V.

Verdünnung	Phrynolysin I	Verdünnung	Phrynolysin I bei Zimmertemperatur über Phosphorsäureanhydrid getrocknet
1 : 20	komplett	1 : 20	komplett
1 : 40	„	1 : 40	„
1 : 80	„	1 : 80	„
1 : 160	„	1 : 160	„
1 : 320	„	1 : 320	„
1 : 640	„	1 : 640	inkomplett
1 : 1280	„	1 : 1280	rot
1 : 2560	„	1 : 2560	0
1 : 5120	„		
1 : 10240	fast komplett		
1 : 20480	Kuppe		
1 : 40960	0		

Wie aus Tabelle I ersichtlich ist, wird Hammelblut am stärksten, Frosch- und Krötenblut gar nicht gelöst. Die Lösungsgrenze für Hammelblut liegt bei Phrynolysin I und II bei einer Verdünnung von 10240, bei Phrynolysin III bei 5120. In Tabelle IV sind fallende Mengen des Giftes zu 1 ccm 5 proz. Hammelblut zugefügt. Von Phrynolysin I genügen 0,0025 ccm, von II und III 0,00025 ccm und von IV 0,005 ccm, um komplette Lösung zu bewirken. Wie sich aus der Trockenrückstandbestimmung von Giftlösung II ergiebt, genügen 0,0000022 g, von Giftlösung III 0,0000015 g organischer Substanz, um 1 ccm 5 proz. Hammelblut völlig zu lösen. Nimmt man an, dafs etwa der zehnte Teil, wahrscheinlich ist er noch geringer, dieser organischen Substanz wirkliches Phrynolysin

darstellt, das Ubrige nur indifferente Eiweifskörper, so genügen $^3/_{10}$ mg Phrynolysin, um ein Liter Hammelblut komplett zu lösen.

Die Ausbeute an Phrynolysin ist individuellen Schwankungen unterworfen. Frisch gefangene Tiere liefern ein stärkeres, solche, die längere Zeit in Gefangenschaft waren, ein schwächeres Hämolysin.

Versuche zur Reaktivierung des bei 56° unwirksam gewordenen Phrynolysins.

Wie die Untersuchungen von Ehrlich und Morgenroth gezeigt haben, sind die Hämolysine der höheren Wirbeltiere komplexer Natur. Sie bestehen aus zwei Teilstücken, dem Komplement und dem Immunkörper. Durch Erwärmen auf 56° wird das Komplement zersört, während der Immunkörper erhalten bleibt. Der Immunkörper kann an und für sich keine hämolytische Wirkung ausüben, es mufs erst ein passendes Komplement hinzugefügt werden.

Es wäre wohl denkbar, dafs das Phrynolysin ebenfalls aus zwei Teilstücken bestehe. Durch Erwärmung auf 56° wäre das Komplement zerstört worden, während der thermostabile Zwischenkörper erhalten geblieben wäre. Ich versuchte deshalb, das bei 56° unwirksam gewordene Toxin durch Zusatz verschiedener normaler Sera, wie Ziegenserum, Hammelserum, Taubenserum, Pferdeserum, Meerschweinchenserum, Kaninchenserum, zu reaktivieren, aber ohne Erfolg, es trat nirgends Lösung ein. Leider war es mir aus Mangel an Material nicht möglich, 1 bis 2 ccm Serum von der Feuerkröte zu erhalten, um damit den Reaktivierungsversuch anzustellen. Die Versuche mit den normalen Sera höherer Wirbeltiere sind nicht beweisend, denn das gesuchte Komplement könnte möglicherweise nur im Serum der Feuerkröte enthalten sein. Die Frage nach der komplexen Natur des Phrynolysins mufs also vorläufig offen gelassen werden.

Enthalten normale Sera Antikörper gegen das Phrynolysin?

Es wurde eine Reihe normaler Sera, die durch Erwärmen auf 56° inaktiviert waren, um die Lösung des hinzugefügten Hammelblutes zu vermeiden, so Taubenserum, Hammelserum, Meerschweinchenserum, Pferdeserum, Kaninchenserum, Ziegenserum darauf hin geprüft. Sämtliche Sera konnten selbst bei Zusatz von 1 bis 2 ccm die Lösung nicht verhindern, obschon nur die einfach lösende Dose Phrynolysin dem Gemisch von Blut und Serum zugesetzt war.

Immunisierung mit dem Phrynolysin.

Um den endgültigen Beweis zu liefern, dafs wir in dem Phrynolysin ein echtes Toxin vor uns haben, wurden mehrere Kaninchen mit demselben immunisiert. Das Gift wurde subkutan injiziert, mit $^1/_2$ ccm begonnen und im Verlauf von acht Tagen auf 5 ccm gestiegen. Die Dose von 5 ccm wurde dann alle fünf bis sechs Tage noch zwei- bis dreimal injiziert, so dafs im Verlauf von drei Wochen etwa 30—35 ccm Toxin gegeben wurden.

Mehr als 5 ccm auf einmal zu geben, ist nicht rätlich, da die Tiere dann in ein bis zwei Tagen sterben. Der Sektionsbefund der an Krötengift zu Grunde gegangenen Tiere ist negativ; aufser einer starken Hyperämie der Bauchorgane ist sonst makroskopisch keine Veränderung der Organe nachzuweisen.

Wie bereits erwähnt, enthält das normale Kaninchenserum keine Spur eines Antikörpers gegen Phrynolysin. Die Produktion von Antitoxin beginnt ungefähr 14 Tage nach der Injektion des Toxins und erreicht nach drei Wochen ihr Maximum. Das stärkste Serum, das ich erhielt, schützte in einer Dose von 0,025 gegen die doppelte lösende Dose Phrynolysin für 1 ccm 5 proz. Hammelblut.

Litteratur.

Vulpian, Compt. rend. de la soc. de biol. 1854, p. 133, u. 1856, p. 124. Dom. Jornara, Sur les effets physiol. du venin de crapaud. Journ. de thérap. 4, p. 833 et 929. G. Calmels, Compt. rend. 98, 536 (1883) und Archiv. de physiol. 1883. Capparelli, Archiv ital. de biol. 4, 72 (1883), Kobert, Sitzungs-Bericht der Dorpater Naturforschenden Gesellschaft 9, 63 (1891). Phisalix u. G. Bertrand, Toxische Wirkung von Blut und Gift der gemeinen Kröte. Compt. rend. 116, 1080—1082, Archiv. de physiol. 25, 511 u. 517 u. Compt. rend. soc. biolog. 45, 477—479. D. Jornara u. A. Casali, Das Gift der Kröte und das Bufidin. Rivista clinica Bologna 1873. A. Pugliese, Die methämoglobinbildende Wirkung des Krötengiftes. Archiv. di farmac. e terap. 1898. Ehrlich u. Morgenroth, Über Hämolysine. Berliner klinische Wochenschr. 1899 Nr. 1 u. 22. 1900 Nr. 21 u. 31. 1901 Nr. 10, 21 u. 22.

Kürzere Mitteilungen.

4. Über die Entstehung von Aceton aus krystallisiertem Ovalbumin.

Von Dr. **Arnold Orgler.**

(Aus dem Laboratorium der I. medizinischen Klinik und dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Blumenthal und Neuberg*) haben aus Gelatine durch Behandlung mit Wasserstoffsuperoxyd und einem Eisen- oder Kupfersalz Aceton erhalten. Ich habe diese Untersuchungen auf krystallisierte Eiweifskörper ausgedehnt. Zu diesem Zwecke stellte ich mir nach dem Hofmeisterschen Verfahren mit den jetzt üblichen Modifikationen krystallisiertes Ovalbumin dar. 5 bis 10 g davon wurden mit 20 ccm 10 proz. Kupfersulfatlösung und 250 ccm Wasserstoffsuperoxyd mehrere Tage stehen gelassen, dann überdestilliert. Das Destillat zeigte einen starken obstartigen Geruch. Der Nachweis des Acetons wurde durch den stark positiven Ausfall der Hydroxylaminprobe**) und die Darstellung der von Blumenthal und Neuberg zum Nachweis des Acetons empfohlenen p-Nitrophenylhydrazinverbindung***) erbracht. Die Formel für Aceton-p-Nitrophenylhydrazon ist

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!\!>\!C:N\text{–}NHC_6H_4(NO)_2 = C_9H_{11}N_3O_2.$$

Die Elementaranalyse der Verbindung ergab

gefunden N = 21,99 berechnet N = 21,76 Proz.

Damit ist die Entstehung von Aceton aus krystallisiertem Ovalbumin erwiesen.

*) Blumenthal und Neuberg, Deutsche medizin. Wochenschr. 1901, Nr. 1.

**) A. Stock, Inaug.-Dissert., Berlin 1899.

***) Bamberger und Sternitzki, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 26, 1306.

Berichtigungen.

Seite	96	Zeile	7	von	oben	lies: 7,39 Proz. H statt 73,92 Proz. H.
„	100	„	2	„	unten	„ : 90^0 statt 20^0.
„	210	„	9	„	oben	„ : Natriumkarbonat statt Zinkkarbonat.
„	385	„	6	„	„	„ : Zunz[40]) statt Zunz[46]).
„	385	„	7	„	„	„ : Duclaux[41]) statt Duclaux[47]).